



**Resposta fisiológica de *Cistus salviifolius* L. proveniente de ambientes extremos (áreas mineiras), em sistemas de hidroponia com diferentes concentrações de arsénio**

**Cláudia de Fátima Freire Vieira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia do Ambiente**

Orientadores: Doutora Maria Manuela Silva Nunes Reis Abreu

Doutora Luísa Cristina dos Mártires Ferreira de Carvalho

**Júri:**

Presidente: Doutor António José Guerreiro de Brito, Professor Associado com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Manuela Silva Nunes Reis Abreu, Professora Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Filipa Rego Pinto, Assistente Convidada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.



# Agradecimentos

Ao Instituto Superior de Agronomia, pela oportunidade da realização do Curso de Mestrado.

À Doutora Maria Manuela Abreu, pela orientação, pelos constantes ensinamentos, motivação e pela confiança depositada.

Ao laboratório de Fisiologia Vegetal, do ISA, em especial à Doutora Luísa Carvalho, pela disponibilidade, apoio, valiosos ensinamentos e por me receber com carinho e simpatia.

À Dr.<sup>a</sup> Maria da Conceição Lopes pela ajuda e apoio incondicional durante toda a realização do Curso de Mestrado, sem a qual nunca teria sido possível a realização do mesmo.

Por fim e não por último, agradeço a paciência e dedico esta dissertação de mestrado à minha filha Diana.

# Resumo

A capacidade de germinação de *Cistus salviifolius* L. foi avaliada em soluções ácidas (pH 2,5; 3; 4; 5 e 6) e em diferentes concentrações de As (25, 100, 500, 1000, 1500, 3000 e 5000 mg L<sup>-1</sup>). Foi também avaliada a resposta fisiológica da espécie ao stresse oxidativo induzido por As a concentrações de 0, 500, 1500, 5000, 20000 e 30000 µg L<sup>-1</sup>, em hidroponia durante 30 dias. Foram analisados vários parâmetros de crescimento, o teor de clorofilas, a composição química, um indicador de stresse oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e dois dos principais elementos de defesa anti-oxidativa (AsA e GSH).

Os resultados mostraram que baixos valores de pH e elevadas concentrações de As não afetaram a taxa de germinação e os parâmetros de crescimento da planta. O efeito tóxico de As foi observado mais significativamente nas plantas submetidas aos tratamentos com as concentrações de 20000 e 30000 µg As L<sup>-1</sup>. As plantas submetidas a estes tratamentos apresentaram maior concentração de As na raiz e na parte aérea, que influenciou as concentrações de Ca, Mg, K e Fe na planta e também grande parte dos parâmetros de crescimento avaliados.

O As não interferiu na capacidade fotossintética da planta, pois não se observaram diferenças significativas nos teores de clorofila *a*, *b* e total entre os diferentes tratamentos. As plantas de todos os tratamentos acumularam maior quantidade de As na raiz do que na parte aérea, e foi também nas raízes que as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AsA e GSH foram maiores.

O *C. salviifolius* revelou elevada tolerância ao As até à concentração de 5000 µg L<sup>-1</sup>, o que o torna numa planta com elevada potencialidade para ser utilizado na fitorremediação de solos fortemente contaminados com As.

**Palavras-chave:** Análise de crescimento, arsénio, *Cistus salviifolius*, fitorremediação, stresse oxidativo

## Abstract

In this work, the capacity of germination of *Cistus salviifolius* L. in acid aqueous solutions (pH 2,5; 3; 4; 5 and 6) and different concentrations of As (25, 100, 500, 1000, 1500, 3000 and 5000 mg L<sup>-1</sup>) was evaluated. The physiological response of the *C. salviifolius* to As induced oxidative stress at concentrations of 0, 500, 1500, 5000, 20000 and 30000 µg L<sup>-1</sup> in hydroponics for 30 days was also evaluated. Several growth parameters, chlorophyll content, chemical composition one indicator of oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and two of the major anti-oxidative metabolites (AsA and GSH) were analyzed.

The toxic effect of As was more forceful in the plants submitted to treatments with concentrations of 20000 and 30000 µg As L<sup>-1</sup>. Plants subjected to these treatments had higher concentration of As in roots and shoots. The concentrations of Ca, Mg, K and Fe in the plants, as well as a large part of the evaluated growth parameters were also affected.

Arsenic did not interfere in the photosynthetic capacity of the plant, because there were no significant differences in the contents of chlorophyll a, b and total between the different treatments. Plants from all treatments accumulated higher amount of As in roots than in shoots, and it was also in the roots that the concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AsA and GSH were higher.

*Cistus salviifolius* showed high tolerance to As up to the concentration of 5000 µg L<sup>-1</sup>, which makes it a species with high potential to be used in the phytostabilization of heavy contaminated soils with As.

**Keywords:** Growth analysis, arsenic, *Cistus salviifolius*, phytoremediation, oxidative stress.

# Índice

1. Preâmbulo.....	- 1 -
2. Introdução.....	- 3 -
2.1. Arsénio .....	- 3 -
2.1.1. Fontes, compostos e espécies de Arsénio .....	- 3 -
2.1.2. Efeito do Arsénio na saúde Humana .....	- 5 -
2.1.3. Comportamento do Arsénio no solo .....	- 6 -
2.1.4. Efeito do Arsénio nas plantas terrestres .....	- 6 -
2.2. Fitorremediação.....	- 8 -
2.2.1. Processos de fitorremediação do Arsénio .....	- 11 -
2.2.1.1. Plantas tolerantes e hiperacumuladoras de Arsénio .....	- 12 -
2.2.1.2. Potencial para a fitorremediação de espécies do género <i>Cistus</i> .....	- 12 -
3. Material e métodos .....	- 17 -
3.1. Material vegetal.....	- 17 -
3.1.1. Caracterização da espécie em estudo: <i>Cistus salviifolius</i> L. ....	- 17 -
3.1.2. Descrição botânica.....	- 18 -
3.1.3. Distribuição e habitat .....	- 19 -
3.2. Germinação.....	- 20 -
3.2.1. Teste de germinação de <i>C. salviifolius</i> em soluções aquosas com diferentes valores de pH.....	- 21 -
3.2.2. Teste de germinação de <i>C. salviifolius</i> em soluções aquosas com diferentes concentrações de As.....	- 21 -
3.3. Efeito de diferentes concentrações de As nos tratamentos em hidroponia ...	- 22 -
3.3.1. Obtenção das plantas .....	- 22 -
3.3.2. Aplicação dos tratamentos .....	- 23 -
3.3.3. Determinação da composição química das plantas .....	- 25 -
3.3.4. Análise de crescimento .....	- 26 -
3.3.4.1. Determinação da área foliar (AF) .....	- 26 -
3.3.4.2. Razão de área foliar (RAF) .....	- 27 -

3.3.5. Determinação das Clorofilas .....	28 -
3.3.6. Quantificação de peróxido de hidrogénio, ascorbatos e glutathionas .....	29 -
3.3.6.1. Extração .....	29 -
3.3.6.2. Determinação do peróxido de hidrogénio .....	29 -
3.3.6.3. Determinação dos ascorbatos .....	30 -
3.3.6.4. Determinação de glutathiona.....	31 -
3.4. Tratamento estatístico .....	31 -
4. Resultados e discussão .....	33 -
4.1. Germinação .....	33 -
4.1.1. Teste de germinação de <i>C. salviifolius</i> em soluções aquosas com diferentes valores de pH.....	34 -
4.1.2. Teste de germinação de <i>C. salviifolius</i> em soluções aquosas com diferentes concentrações de As.....	37 -
4.2. Efeito de diferentes concentrações de As nos tratamentos em hidroponia ...	42 -
4.2.1. Análise da composição química das plantas.....	43 -
4.2.2. Análise de crescimento .....	48 -
4.2.2.1. Taxa de mortalidade .....	48 -
4.2.2.2. Comprimento da planta.....	49 -
4.2.2.3. Massa fresca e massa seca .....	51 -
4.2.2.4. Número de folhas, área foliar e razão de área foliar.....	54 -
4.2.3. Efeito do As no teor de clorofilas .....	57 -
4.2.4. Efeito do As na concentração de peróxido de hidrogénio.....	60 -
4.2.5. Efeito do As na concentração de ascorbatos e glutathionas .....	63 -
5. Conclusões.....	72 -
6. Referências Bibliográficas .....	75 -
Anexos.....	84 -
<b>Anexo I</b> – Ensaio de germinação de <i>C. salviifolius</i> em soluções com diferentes valores de pH, ao fim de 21 dias.....	84 -
<b>Anexo II</b> – Valores médios e desvios-padrão da taxa de germinação final (21 dias), obtidos experimentalmente para soluções aquosas com diferentes valores de pH.....	85 -

<b>Anexo III</b> – Ensaio de germinação de <i>C. salviifolius</i> em soluções com diferentes concentrações de As, ao fim de 30 dias. ....	- 86 -
<b>Anexo IV</b> – Valores médios e desvios-padrão da taxa de germinação final (30 dias) obtidos experimentalmente para os diferentes tratamentos de As e controlo. ....	- 87 -
<b>Anexo V</b> – Ensaio de crescimento de <i>C. salviifolius</i> ao longo do tempo de tratamento com As. ....	- 88 -
<b>Anexo VI</b> – Crescimento de <i>C. salviifolius</i> após 30 dias de tratamento com As. ....	- 89 -
<b>Anexo VII</b> – Comprimento da raiz (média $\pm$ desvio-padrão) de <i>C. salviifolius</i> , ao longo de 30 dias de ensaio em diferentes tratamentos de As. ....	- 90 -
<b>Anexo VIII</b> – Comprimento da parte aérea (média $\pm$ desvio-padrão) das plantas em estudo, ao longo de 30 dias de ensaio e expostas a diferentes tratamentos de As. ....	- 91 -
<b>Anexo IX</b> – Massa fresca total (média $\pm$ desvio-padrão) de <i>C. salviifolius</i> , ao longo de 30 dias de ensaio em diferentes tratamentos de As. ....	- 92 -
<b>Anexo X</b> – Número médio de folhas e respetivo desvio-padrão ao longo do período de tratamento com As. ....	- 93 -
<b>Anexo XI</b> – Valores da área foliar (média $\pm$ desvio-padrão) de <i>C. salviifolius</i> , ao longo do período de tratamento com As (30 dias). ....	- 94 -
<b>Anexo XII</b> – Concentração de ascorbato total (ASC), oxidado (DAsA) e reduzido (AsA) (média $\pm$ desvio-padrão) na raiz e na parte aérea das plantas de <i>C. salviifolius</i> expostas aos diferentes tratamentos com As, ao longo do período de ensaio. ....	- 95 -
<b>Anexo XIII</b> – Concentração de glutatona total, oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) (média $\pm$ desvio-padrão) na raiz e na parte aérea das plantas de <i>C. salviifolius</i> expostas aos tratamentos com diferentes concentrações de As, ao longo do período de ensaio. ....	- 96 -
<b>Anexo XIV</b> – Coeficientes de correlação de Spearman entre a concentração de As e as concentrações dos elementos químicos analisados (Ca, Mg, Mn, Cu, Fe, K, P e Zn) na raiz e na parte aérea das plantas, no final do ensaio. ....	- 97 -
<b>Anexo XV</b> – Coeficientes de correlação de Spearman entre a concentração de As e as variáveis fisiológicas, no final do ensaio. ....	- 98 -
<b>Anexo XVI</b> – Coeficientes de correlação de Spearman entre a concentração de As e as concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , glutatonas e ascorbatos na raiz e parte aérea das plantas, no final do ensaio. ....	- 99 -



# Índice de Figuras

Figura 1 – Principais mecanismos de remoção de $H_2O_2$ e de $O_2^{\cdot-}$ : a) superóxido-dismutase (SOD); b) catalase (CAT), c) ciclo ascorbato-glutationa e d) ciclo da glutational-peroxidase.....	15 -
Figura 2 – Arbusto <i>Cistus salviifolius</i> L.....	18 -
Figura 3 – a) Folhas de <i>Cistus salviifolius</i> ; b) Flor de <i>Cistus salviifolius</i> . ....	18 -
Figura 4 - Ensaio de germinação de <i>C. salviifolius</i> em diferentes soluções aquosas.....	20 -
Figura 5 - Crescimento em hidroponia de plantas de <i>C. salviifolius</i> com ~3 cm.....	22 -
Figura 6 – Início do primeiro ensaio de hidroponia de plantas de <i>C. salviifolius</i> em diferentes tratamentos de As (controlo, 500, 1500 e 5000 $\mu g L^{-1}$ ). ....	24 -
Figura 7 – Desenvolvimento das plântulas resultantes da germinação das sementes submetidas ao tratamento de As com a concentração de 1500 $\mu g L^{-1}$ , existentes na mesma placa de germinação, ao fim de 30 dias. ....	33 -
Figura 8 – Desenvolvimento das plântulas resultantes da germinação das sementes submetidas ao tratamento com pH 4, existentes na mesma placa de germinação, após 21 dias.....	33 -
Figura 9 – Variação da taxa de germinação acumulativa (%) das sementes de <i>C. salviifolius</i> em tratamentos com diferentes valores de pH, ao longo de 21 dias. ....	35 -
Figura 10 – Comprimento da raiz medido no último dia do ensaio (21 dias) das plantas germinadas em tratamentos com diferentes valores de pH. ....	36 -
Figura 11 – Comprimento do caule medido no último dia do ensaio (21 dias) das plantas germinadas em tratamentos com diferentes valores de pH. ....	36 -
Figura 12 – Comprimento médio da maior folha medido no último dia do ensaio (21 dias) das plantas germinadas nos tratamentos com diferentes valores de pH. ....	37 -
Figura 13 – Taxa de germinação acumulativa (%) das sementes de <i>C. salviifolius</i> , para o período de 30 dias, para os tratamentos com diferentes concentrações de As. ....	38 -
Figura 14 – Comprimento médio da raiz medido no último dia do ensaio (30 dias) das plantas germinadas em diferentes tratamentos de As. ....	39 -
Figura 15 – Comprimento médio do caule medido no último dia do ensaio (30 dias) das plantas germinadas em tratamentos com diferentes concentrações de As.....	40 -
Figura 16 – Comprimento médio da maior folha medido no último dia do ensaio (30 dias) das plantas germinadas em tratamentos com diferentes concentrações de As.....	41 -
Figura 17 – Massa fresca média das plantas germinadas obtida no último dia do tratamento (30 dias). ....	41 -
Figura 18 – Teor de água das plantas de germinadas, obtido no último dia do tratamento (30 dias).....	42 -

Figura 19 – Taxa de mortalidade das plantas ao longo do ensaio registadas nos tratamentos com as concentrações de 20000 e 30000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As.....	48 -
Figura 20 – Desenvolvimento de uma planta de <i>C. salviifolius</i> exposta ao tratamento com 30000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As, ao longo do período do ensaio (30 dias).....	49 -
Figura 21 – Variação do comprimento médio da raiz das plantas ao longo do período de tratamento com As.....	50 -
Figura 22 – Variação do comprimento médio da parte aérea das plantas ao longo do período de tratamento com diferentes concentrações de As.....	51 -
Figura 23 – Variação da massa fresca total média de <i>C. salviifolius</i> , ao longo do período de tratamento com diferentes concentrações de As.....	52 -
Figura 24 – Massa fresca da raiz e da parte aérea de <i>C. salviifolius</i> , no final do ensaio (30 dias), nos tratamentos com diferentes concentrações de As.....	53 -
Figura 25 – Massa seca nos tratamentos com diferentes concentrações de As no final dos ensaios I e II (30 dias), e respetivo controlo no início e final dos ensaios I (500, 1500 e 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As) e II (20000 e 30000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As).....	54 -
Figura 26 – Variação do número médio de folhas ao longo do período de ensaio de tratamento com diferentes concentrações de As.....	55 -
Figura 27 – Variação da área foliar (AF) ao longo do período de ensaio nos tratamentos com diferentes concentrações de As. ....	56 -
Figura 28 – Razão da área foliar (RAF) nos tratamentos com diferentes concentrações de As no final dos ensaios I (30 dias), e respetivo controlo no início e final dos ensaios I (500, 1500 e 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As). ....	57 -
Figura 29 – Teor médio de clorofilas <i>a</i> , <i>b</i> e total, expresso em $\text{mg cm}^{-2}$ de área foliar, para o ensaio de hidroponia de <i>Cistus salviifolius</i> submetido às concentrações de 0,0 (controlo), 500, 1500, 5000, 20000 e 30000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As durante trinta dias, e também para o controlo no início do ensaio (zero dias). ....	58 -
Figura 30 – Razão clorofila <i>a/b</i> obtida no ensaio de hidroponia de <i>C. salviifolius</i> , submetido às concentrações de 0,0 (controlo), 500, 1500, 5000, 20000 e 30000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As durante trinta dias, e também para o controlo no início do ensaio (zero dias). ....	59 -
Figura 31 – Concentração média de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) quantificado na raiz das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias.....	61 -
Figura 32 – Concentração média de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) quantificado na parte aérea das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias. ....	62 -
Figura 33 – Concentração média de AsA quantificado na raiz das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias. ....	64 -

Figura 34 – Concentração média de AsA na parte aérea das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias. ....	64 -
Figura 35 – Concentração média de DAsA quantificado na raiz das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias. ....	65 -
Figura 36 – Concentração média de DAsA na parte aérea das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias. ....	65 -
Figura 37 – Percentagem de redução de ascorbato na raiz das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante 30 dias.....	66 -
Figura 38 – Percentagem de redução de ascorbato na parte aérea das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante 30 dias.....	67 -
Figura 39 – Concentração média de GSH quantificada na raiz das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias. ....	68 -
Figura 40 – Concentração média de GSH na parte aérea das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias. ....	68 -
Figura 41 – Concentração média de GSSG quantificada na raiz das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias. ....	69 -
Figura 42 – Concentração de GSSG quantificada na parte aérea das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias.....	69 -
Figura 43 – Percentagem de redução de glutathiona na raiz das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante 30 dias.....	70 -
Figura 44 – Percentagem de redução de glutathiona na parte aérea das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante 30 dias.....	71 -

# Índice de Quadros

Quadro I – Visão global dos principais processos de Fitorremediação (EPA, 2000).....	10 -
Quadro II – Composição e concentração das soluções padrão da solução nutritiva para cultivo de <i>Cistus</i> sp. (Rossini <i>et al.</i> , 2010).....	23 -
Quadro III – Valores médios e desvios-padrão do tempo decorrido até ao início da germinação das sementes de <i>C. salviifolius</i> ( $t_0$ ) e do tempo decorrido até alcançar 50% da taxa de germinação final ( $t_{50}$ ), obtidos experimentalmente para soluções aquosas com diferentes valores de pH. ....	35 -
Quadro IV – Valores médios e desvios-padrão do tempo decorrido até ao início da germinação das sementes de <i>C. salviifolius</i> ( $t_0$ ) e do tempo decorrido até se alcançar 50% da taxa de germinação final ( $t_{50}$ ) obtidos experimentalmente para os diferentes tratamentos de As e controlo. ....	39 -
Quadro V – Concentração de elementos químicos As, Ca, Mg, Mn, Cu, Fe, K, P e Zn (média $\pm$ desvios-padrão) nas raízes e na parte aérea das plantas, submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias.....	44 -

## Lista de abreviaturas

AF – Área foliar

APX – Ascorbato peroxidase

ASC – Ascorbato

AsA – Ascorbato reduzido (ácido ascórbico)

CAT – Catalase

DAsA – Desidroascorbato

DHAR – Desidroascorbato redutase

GPOD – Guaiacol peroxidase

GPX – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione redutase

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogénio

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – Superóxido

MDAsA – Monodesidroascorbato

NADPH – Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato

RAF – Razão de área foliar

ROS – Espécies reativas de oxigénio (*reactive oxygen species*)

SOD – Superóxido dismutase

# 1. Preâmbulo

A contaminação dos solos é um problema ambiental que afeta as populações localizadas junto a fontes de poluição como são as áreas de extração mineira, comprometendo a utilização da água e a atividade agrícola nesses locais degradados.

O arsénio é um dos elementos mais tóxicos que pode estar presente nesses ambientes com repercussões graves nas plantas, animais e na saúde humana, sendo considerado um elemento carcinogénico humano. O seu elevado teor no solo é de grande preocupação devido à sua fácil absorção pelas plantas e entrada na cadeia alimentar, e a sua lixiviação pode contaminar as águas superficiais e subterrâneas, chegando ao Homem quer pelos alimentos quer pela água.

A forma de efetuar a recuperação desses locais contaminados que se apresenta mais acessível e de baixo custo é através da fitorremediação, que utiliza as plantas na remoção ou imobilização de poluentes sob formas não tóxicas. Para além de contribuírem para a estabilização física e química de solos/resíduos em áreas mineiras ricas em metais e metaloides, as plantas permitem restaurar esses ecossistemas degradados e a sua valorização paisagística, mitigando o impacto negativo dessa atividade económica no ambiente.

O *Cistus salviifolius* L. é uma das espécies autóctones que cresce em muitas dessas áreas degradadas, com pouca exigência nutricional e adaptada à xericidade do clima mediterrânico, apresentando tolerância à presença dos metais e metaloides potencialmente tóxicos.

A presente dissertação tem como objetivo avaliar o potencial de *C. salviifolius* para ser utilizado em programas de fitoestabilização em áreas contaminadas com As, particularmente em área mineiras. Para isso, foi avaliada a sua capacidade de germinação em soluções aquosas com diferentes valores de pH, na gama ácida, e com diferentes concentrações de As, e a sua resposta fisiológica a concentrações elevadas de As ao longo do seu desenvolvimento em sistema de hidroponia.

O presente trabalho está estruturado em cinco capítulos. No presente capítulo é feita uma breve introdução sobre o tema e o objetivo concreto deste estudo. O segundo capítulo constitui a revisão bibliográfica que descreve o âmbito do tema em estudo e serve de suporte à interpretação dos resultados que se obtiveram. No terceiro capítulo, Materiais e Métodos, é feita a descrição dos ensaios experimentais e os métodos utilizados. Nos Resultados e Discussão, quarto capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos. Por último, nas Conclusões, o quinto capítulo, são apresentadas de forma sucinta

as principais conclusões obtidas da análise dos dados que contribuem para o cumprimento do objetivo proposto na elaboração deste trabalho.

## 2. Introdução

### 2.1. Arsénio

Os poluentes inorgânicos, como metais e metaloides, são largamente disseminados nos ecossistemas terrestres, aquáticos e marinhos, por processos geoquímicos ou antrópicos.

O As é um desses poluentes que, em concentrações elevadas e por exposição prolongada, apresenta elevada toxicidade para os seres vivos, pois é bioacumulável, passando através da cadeia trófica.

O As é um metaloide, com propriedades intermédias de um metal e de um não-metal. No estado elementar é sólido, cristalino, e apresenta-se em três formas alotrópicas, amarela (alfa), preta (beta) e cinza (gama). Descoberto em 1250 por Alberto Magno (Chang, 1994) e usado há mais de dois mil anos pelo Homem, inicialmente para fins medicinais, é sobretudo conhecido como o veneno eleito na orquestração de vários suicídios e homicídios.

#### 2.1.1. Fontes, compostos e espécies de Arsénio

Na natureza, o As é encontrado no estado elementar ou combinado com um grande número de outros elementos químicos, formando compostos na sua maioria cristalinos, destacando-se a arsenopirite ( $\text{FeAsS}$ ), a arsenolite ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ), a colbatite ( $\text{CoAsS}$ ) e o ouro-pigmento ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ) (Albert, 1988). É habitual encontrá-lo como um componente em compostos inorgânicos (associado ao O, Fe, Cl e/ou S) ou em compostos orgânicos (ácido monometilarsenoso, ácido dimetilarsínico, arsenocolina, arsenobetaína, arsina e derivados, etc.).

O As ocorre em vários estados de oxidação (-3, 0, +3, +5) e a sua toxicidade depende da sua forma química. Os compostos químicos mais tóxicos são o trióxido de arsénio ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) e o arsenito de sódio ( $\text{NaAsO}_2$ ), ambos compostos da forma trivalente do As.

Nos compostos mais comuns de As este elemento ocorre na forma aniónica como arsenato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) ou arsenito ( $\text{AsO}_2^-$ ), sendo este muito mais tóxico que o arsenato, mas em meio aeróbio é rapidamente oxidado em arsenato, sendo esta a forma predominante do As



nos solos e na água. Contudo, arsenato e arsenito podem interconverter-se dependendo das condições oxidantes ou redutoras do meio, e sofrer processos de metilação. As formas orgânicas são menos tóxicas que as inorgânicas (Frumkin & Thun, 2001; WHO, 2001).

Em condições normais, sem influência antrópica ou qualquer anomalia natural, o As existe em maior proporção nos xistos ( $13 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e em menor quantidade nos calcários e arenitos ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ). A concentração média na água do mar é de  $0,0037 \text{ mg L}^{-1}$ , e de  $0,0005 \text{ mg L}^{-1}$  na água doce. Nas plantas terrestres a sua concentração varia entre 0,2 e  $7 \text{ mg kg}^{-1}$  de massa seca, nos mamíferos de  $0,087\text{--}1,69 \text{ mg kg}^{-1}$  de massa seca, e no peixe marinho de  $0,2\text{--}10 \text{ mg kg}^{-1}$  de massa seca (Freedman, 1995).

A atividade vulcânica é a principal fonte natural de As, seguindo-se a volatilização a partir de várias matérias-primas (WHO, 2001). Nas águas subterrâneas pode haver elevada concentração de As na forma inorgânica com origem natural proveniente das rochas ou dos sedimentos com os quais entra em contacto. São exemplos dramáticos deste tipo de contaminação natural as águas subterrâneas do Bangladesh (WHO, 2001), em algumas zonas da Tailândia e do Japão, a norte do Chile, sudoeste da Bolívia, a sul do Peru e da Argentina, etc., com populações inteiras expostas a elevadas concentrações de As (Albert, 1988; Frumkin & Thun, 2001).

Contudo, a maior parte do As que existe no ambiente tem origem antrópica. Estima-se que a emissão global para atmosfera de As por origem natural seja  $28 \times 10^8 \text{ g ano}^{-1}$  e por origem antrópica  $780 \times 10^8 \text{ g ano}^{-1}$  (Freedman, 1995). Este elemento é libertado para a atmosfera pela fundição de minerais sobretudo ferrosos, combustão de carvão e petróleo, incineração de resíduos e pelos fornos das fábricas de vidro (Albert, 1988). Durante muitos anos foi lançado nos solos incorporado em pesticidas, herbicidas ou outro tipo de composto para uso agrícola, havendo atualmente legislação no sentido de não integrar o As nestes compostos. É principalmente utilizado em produtos conservantes da madeira. Para além disso, é usado em componentes eletrónicos e semicondutores (arsina,  $\text{AsH}_3$ ), em ligas de Cu e Pb, na medicina humana e veterinária (Albert, 1988; Frumkin & Thun, 2001).

A exploração mineira é a principal fonte antrópica de As e de metais potencialmente tóxicos (Cu, Cr, Fe, Mn, Pb, Zn, etc.) no ambiente. Estima-se que na crosta terrestre exista em média  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  de As (Albert, 1988), nos solos não contaminados cerca de  $6 \text{ mg kg}^{-1}$  (Freedman, 1995), em solos considerados contaminados de 100 a  $102\,000 \text{ mg kg}^{-1}$  com o limite regulamentar de  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  (Sinha & Sinha, 2008), e nos solos de áreas mineiras o seu valor pode variar de poucas dezenas a alguns milhares de  $\text{mg kg}^{-1}$  de As (Anawar *et al.*, 2011; Márquez-García *et al.*, 2012).

A atividade mineira pode comprometer o uso dos solos na agricultura, pastoreio e o uso dos recursos hídricos para abastecimento das populações e para a rega, para além da

perda de biodiversidade, com impacto negativo na economia da região após o abandono da exploração e com riscos para a saúde.

### **2.1.2. Efeito do Arsénio na saúde Humana**

O As pode ter consequências graves na saúde humana devido às suas propriedades carcinogénicas, mutagénicas e teratogénicas. Outras doenças associadas ao As são a diabetes, doenças vasculares periféricas, hepáticas, nervosas, renais, dano gastrointestinal, anemia, arritmias, dermatoses, etc. (Albert, 1988; Frumkin & Thun, 2001; WHO, 2001). Os efeitos provocados pela exposição ao As dependem da espécie, da quantidade, da duração e da via de absorção.

Existem várias vias de exposição ao As, tais como o consumo de água contaminada, a ingestão de vegetais (alimentos) produzidos em solos contaminados e que tenham absorvido e concentrado o elemento, ingestão accidental de poeiras através da via mão-boca, a inalação de poeiras e através da derme, podendo numa dada região a via de absorção ser apenas uma ou várias, sendo o risco para a saúde diferente dependendo da via (Albert, 1988; Lee *et al.*, 2008).

No organismo humano, o As concentra-se nos leucócitos e acumula-se no fígado, pulmão, rins, ossos, dentes, cabelos, unhas e na pele (Albert, 1988). A relação entre a exposição ao As e o risco de desenvolver cancro do pulmão está bem documentada (Albert, 1988), sendo a principal causa a absorção por inalação de poeiras com concentrações superiores a  $54,6 \mu\text{g As m}^3$ . O grupo de maior risco são os trabalhadores das fábricas de pesticidas com As, da fundição do Cu e da exploração mineira (Frumkin & Thun, 2001).

Os alimentos têm na sua constituição, além dos compostos inorgânicos, grande quantidade de compostos orgânicos de As (WHO, 2001). De entre os alimentos com maior risco encontram-se os peixes de água doce oriundos de águas com elevadas concentração de As, que geralmente também estão contaminadas por metais (Shah *et al.*, 2011), e os produtos agrícolas produzidos em solos ricos em As e/ou regados por águas contaminadas (Lee *et al.*, 2008). Uma dieta pouco variada com o consumo exclusivo de alimentos contaminados leva a um maior risco de doenças. No entanto, os invertebrados marinhos e peixes de água salgada são bioacumuladores de As sobretudo na forma orgânica, nomeadamente arsenobetaina, que não é tóxica nem cancerígena para o Homem, mas o mesmo não acontece com as algas marinhas, que acumulam grandes quantidades de As na forma inorgânica (Neff, 1997).

A exposição ao As através do consumo de água está associada ao cancro do trato urinário, do pulmão, da pele, e suspeita-se que também ao do cólon e do fígado (Frumkin &

Thun, 2001). Esta é a principal via de exposição ao As (Adriano, 2001; WHO, 2001). O limite máximo estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para a água potável é de 0,01 mg L<sup>-1</sup> de As (WHO, 1993).

Perante a elevada toxicidade, bioacumulação e persistência deste elemento, a diretiva quadro da água (DIRECTIVA 2000/60/CE) identificou o As e respetivos compostos como um dos principais poluentes da água. O Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de Agosto, estabeleceu o valor máximo admissível de As na água de abastecimento público em Portugal em 0,05 mg L<sup>-1</sup>, o valor máximo admissível para a água destinada à rega em 10 mg L<sup>-1</sup>, e definiu a concentração 0,1 mg L<sup>-1</sup> como objetivo ambiental de qualidade mínima para as águas superficiais. Posteriormente, através do Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de Agosto, foi estabelecido o valor de 0,01 mg L<sup>-1</sup> para as águas de consumo humano, de acordo com o valor indicado pela OMS.

### **2.1.3. Comportamento do Arsénio no solo**

A disponibilidade do As no solo é geralmente controlada pela sua própria concentração total, pH, potencial redox e pela matéria orgânica (Adriano, 2001). O As adquire maior mobilidade no solo com o aumento de pH, encontrando-se sobretudo na forma solúvel de arsenato de sódio (Na<sub>3</sub>AsO<sub>4</sub>) em solos alcalinos. O As em solos com valores de pH baixos pode encontrar-se adsorvido nas partículas coloidais do solo principalmente os óxidos e oxi-hidróxidos de Fe e Al o que contribui para a diminuição da sua mobilidade (Baronia *et al.*, 2004; Garcia-Sanchez & Alvarez-Ayuso, 2003). O valor de pH e as condições de oxi-redução são os principais fatores determinantes da especiação do As presente no solo (Baronia *et al.*, 2004; Garcia-Sanchez & Alvarez-Ayuso, 2003).

O arsenato e o arsenito são as formas inorgânicas, biodisponíveis de As na solução do solo (Meharg & Hartley-Whitaker, 2002). Estas espécies podem ser convertidas em As orgânico através de processos de metilação/desmetilação nos quais os micro-organismos são intervenientes (Turpeinen *et al.*, 1999). O arsenato é geralmente a espécie química dominante do As no solo (Márquez-García *et al.*, 2012).

### **2.1.4. Efeito do Arsénio nas plantas terrestres**

O As faz parte da constituição da maioria das plantas, mas pouco se sabe sobre o seu papel bioquímico, podendo apenas ser absorvido de forma passiva com a água do solo

(Kabata-Pendias, 2011). Essa absorção depende da biologia da própria espécie, das características físico-químicas dos solos, da concentração e da forma biodisponível do As (Abreu *et al.*, 2012).

Segundo Kabata-Pendias (2011) a concentração de As nas folhas considerada normal para a maioria das plantas é de 1–1,7 mg As kg<sup>-1</sup>, e a referenciada como fitotóxica varia entre 5–20 mg As kg<sup>-1</sup>.

Em vários estudos realizados, os sintomas da toxicidade de As observados em plantas foram os seguintes: clorose internerval, seguida de necrose foliar (Melo *et al.*, 2007); diminuição do crescimento da planta e do tamanho dos frutos (Carbonell-Barrachina *et al.*, 1995; Kabata-Pendias, 2011); descoloração e plasmólise da raiz, murchidão e necrose nas pontas e margens das folhas (Machlis, 1941; Kabata-Pendias, 2011); diminuição da área foliar e da capacidade fotossintética (Marin *et al.*, 1993); murchidão e avermelhamento das folhas, e diminuição do tamanho das raízes (Sneller *et al.*, 1999).

Estudos indicam que o arsenato é translocado pelo mesmo sistema de transporte do fosfato e que a presença deste reduz a absorção do arsenato devido à elevada afinidade do sistema de absorção pelo fosfato (Meharg & Hartley-Whitaker, 2002).

Como os iões arsenato (AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) e fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) são quimicamente semelhantes, o AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup> pode interferir no metabolismo do fosfato, uma vez que, nas células da planta o arsenato é convertido em arsenito, este por sua vez, reage com os grupos sulfidrilo (-SH) de enzimas e proteínas conduzindo à inibição das funções da célula resultando na morte dos tecidos celulares (Meharg & Hartley-Whitaker, 2002).

Como os elementos As e P têm configurações eletrônicas e propriedades químicas semelhantes, têm também comportamentos semelhantes no solo, competindo pelos mesmos sítios de adsorção no solo (ou permanecendo em solução) e absorção pela planta (Adriano, 2001). Aparentemente, a toxicidade do As diminui quando a planta está bem nutrida de P (Kabata-Pendias, 2011), segundo alguns estudos, elevadas concentrações de fosfato podem diminuir a absorção de arsenato pelas plantas e os seus efeitos tóxicos (Sneller *et al.*, 1999; Tu & Ma, 2003). Contudo, esse comportamento depende do tipo de solo e da espécie vegetal, uma vez que, a presença de P no solo não implica necessariamente a sua biodisponibilidade (pode estar retido/fixado no solo) (Tu & Ma, 2003), e há espécies menos tolerantes que outras.

Por outro lado, altas concentrações de As podem provocar carência de P na planta, porque o As absorvido por engano pela planta não consegue substituir o P nos processos de transferência de energia (Tu & Ma, 2003).

A acumulação do As nos tecidos das plantas pode ser feita numa ou mais formas químicas (orgânica e/ou inorgânica), dependendo da espécie vegetal, o que indica que não

existe apenas um mecanismo para lidar com o As e que cada planta poderá ter desenvolvido o seu (Márquez-García *et al.*, 2012).

As plantas resistentes poderão compartimentar e/ou converter o As inorgânico noutras espécies de As menos fitotóxicas para suportar as elevadas concentrações de As nas células (Meharg, 1994 in Meharg & Hartley-Whitaker, 2002).

## **2.2. Fitorremediação**

São diversas as atividades humanas que depositam elevadas quantidades de substâncias tóxicas nos solos degradando-os, como por exemplo a já referida atividade mineira, a deposição de lamas de águas residuais urbanas ou pecuárias, descargas de efluentes industriais, derrames de combustíveis, etc., contribuindo igualmente para a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, e de solos adjacentes por lixiviação ou através de material particulado, disperso por via aérea e/ou erosão.

O tratamento de áreas contaminadas por metais e metaloides, pode ser feita por meio de métodos convencionais *ex situ* ou *in situ*, tais como, escavação e remoção dos solos, seguida de tratamento ou deposição em aterros, oxidação química, extração por solventes, remediação eletrocinética, entre outros (Bech *et al.*, 2014).

A fitorremediação é uma biotecnologia relativamente recente, não invasiva, que utiliza a capacidade das plantas (e os microrganismos rizosféricos associados) com potencial para absorver e acumular, e/ou imobilizar produtos orgânicos (petróleo e seus derivados, herbicidas, pesticidas, explosivos, etc.) e/ou elementos ou compostos inorgânicos (metais, metaloides, radionuclídeos) tóxicos em ambientes terrestres, aquáticos e atmosféricos, isto é, torná-los em formas não tóxicas (Abreu & Magalhães, 2009; EPA, 2000; Sinha & Sinha, 2008).

Os principais mecanismos de fitorremediação são a fitoextração, a fitoestabilização, a fitodegradação (ou fitotransformação), fitovolatilização, rizodegradação e rizofiltração (Alkorta *et al.*, 2004; EPA, 2000; Sinha & Sinha, 2008). A escolha do tipo de mecanismo depende sobretudo do tipo de poluente e do ambiente onde se encontra (Quadro 1).

A fitoextração consiste na capacidade da planta para absorver contaminantes inorgânicos (metais, metaloides e radionuclídeos) e acumulá-los nos seus tecidos. Posteriormente, a planta é colhida e removida para um local onde sofra a extração dos poluentes, compostagem, utilização na produção de materiais, incineração ou a simples deposição em aterros (Vangronsveld *et al.*, 2009).

As plantas adequadas para a fitorremediação na vertente de fitoextração têm que ser tolerantes ao poluente, acumular quantidades significativas na parte aérea, ter crescimento

rápido, produzir uma quantidade de biomassa razoável e ter um sistema radicular profundo (Alkorta *et al.*, 2004; Vangronsveld *et al.*, 2009).

Para a fitoextração são usualmente escolhidas espécies hiperacumuladoras do contaminante a extrair. Estas plantas acumulam na parte aérea grandes quantidades do poluente. Em termos gerais uma planta hiperacumuladora deve ter a capacidade de acumular entre 10 a 100 vezes mais elementos potencialmente tóxicos do que as outras espécies de plantas normalmente acumulam num solo contaminado (0,1% a 1% da massa seca, dependendo do contaminante) (McGrath *et al.*, 2002; Singh & Ma, 2007). Na fitoextração também podem ser usadas espécies não acumuladoras mas com rápida e elevada produção de biomassa (Vangronsveld *et al.*, 2009).

Uma das principais limitações do processo de fitoextração é a profundidade da área de tratamento que é determinada pelo alcance do sistema radicular da planta, o que depende da espécie, do tipo de solo e das condições climáticas (EPA, 2000; Vangronsveld *et al.*, 2009). Além disso, a maioria das plantas hiperacumuladoras conhecidas só acumula um determinado poluente. Por outro lado, é uma tecnologia com obtenção lenta de resultados, limitada pela taxa de crescimento das plantas, sendo pouco viável quando existe levado risco para o Homem e para os ecossistemas (EPA, 2000; Vangronsveld *et al.*, 2009). Outra limitação ocorre quando a concentração do contaminante é elevada, podendo inibir o crescimento da planta e até ser letal (EPA, 2000; Vangronsveld *et al.*, 2009).

A fitoestabilização é definida como a imobilização de um contaminante no solo através da absorção e acumulação nas raízes, adsorção nas raízes ou precipitação na rizosfera, reduzindo a sua mobilidade por lixiviação e dispersão através das águas ou do ar, ou ainda a sua entrada na cadeia trófica, diminuindo o risco para a saúde humana e para o ambiente (Abreu & Magalhães, 2009; EPA, 2000; Sinha & Sinha, 2008). Tem a vantagem de não ser necessária a colheita e remoção das plantas contaminadas para outro local, promove a estabilização física do solo pelas raízes da planta; protege a superfície do solo contra a erosão eólica e hídrica, e cria uma paisagem visual agradável (Abreu & Magalhães, 2009). Por outro lado, como o contaminante permanece no local, é necessária a permanente manutenção das plantas (como por exemplo fertilização) e monitorização da rizosfera, pois pode ocorrer a solubilização do contaminante (EPA, 2000; Vangronsveld *et al.*, 2009). A fitoestabilização é uma solução prática para grandes áreas contaminadas, de simples aplicação e com custos mais reduzidos que as outras técnicas de fitorremediação (Mahar *et al.*, 2016). É necessária uma escolha adequada de plantas, focada principalmente em espécies nativas, pioneiras e tolerantes, que crescem nas áreas degradadas e um plano de monitorização a longo prazo para avaliar as respostas da vegetação e a evolução físico-química dos solos ou dos resíduos (Abreu & Magalhães, 2009).

A fitodegradação é o mecanismo que utiliza a capacidade da planta para absorver e degradar contaminantes orgânicos nos seus tecidos através de processos metabólicos ou no seu exterior através de enzimas que liberta (Alkorta *et al.*, 2004; EPA, 2000). Tem a vantagem de poder degradar compostos num ambiente estéril, onde os micro-organismos não sobrevivem, mas por outro lado podem-se formar produtos intermediários tóxicos e é difícil de quantificar e identificar os metabolitos responsáveis pela degradação (EPA, 2000).

Quadro I – Visão global dos principais processos de Fitorremediação (EPA, 2000).

<b>Processo de fitorremediação</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Ambiente</b>	<b>Contaminante</b>
<b>Fitoextração</b>	Extração e captura	Solo, sedimentos e lamas	Metais: Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn Radionuclídeos: <sup>90</sup> Sr, <sup>137</sup> Cs, <sup>239</sup> Pu, <sup>238</sup> U, <sup>234</sup> U As
<b>Fitoestabilização</b>	Contenção e imobilização	Solo, sedimentos e lamas	As, Cd, Cr, Cu, Hs, Pb, Zn
<b>Fitodegradação</b>	Destruição	Solo, sedimentos, lamas, águas subterrâneas e superficiais	Compostos orgânicos, solventes clorados, fenóis, herbicidas, munições
<b>Fitovolatilização</b>	Extração do meio e libertação para a atmosfera	Solo, sedimentos, lamas e águas subterrâneas	Solventes clorados, Se, Hg e As
<b>Rizodegradação</b>	Destruição	Solo, sedimentos, lamas, águas subterrâneas	Compostos orgânicos: hidrocarbonetos de petróleo, hidrocarbonetos poliaromáticos, pesticidas, solventes clorados, Bifenilos Policlorados (PCBs)
<b>Rizofiltração</b>	Extração e captura	Águas subterrâneas e superficiais	Metais: Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn Radionuclídeos: <sup>90</sup> Sr, <sup>137</sup> Cs, <sup>239</sup> Pu, <sup>238</sup> U, <sup>234</sup> U

A fitovolatilização compreende a absorção, translocação e eliminação do contaminante pela planta para a atmosfera, após a sua conversão num composto volátil (EPA, 2000; Sinha & Sinha, 2008). Não há controlo sobre a dispersão do contaminante na atmosfera, nem sobre os metabolitos tóxicos que podem ser produzidos.

A rizodegradação recorre à capacidade de as plantas libertarem exsudados radiculares (açúcares, aminoácidos, enzimas, ácidos gordos, etc.) que aumentam a biodegradação microbiana dos contaminantes orgânicos na rizosfera (Alkorta *et al.*, 2004; EPA, 2000). Tem a vantagem da degradação ocorrer na fonte da contaminação, sem serem absorvidos pela planta (EPA, 2000).

A rizofiltração consiste no uso das raízes das plantas para absorver, concentrar ou precipitar os poluentes inorgânicos do meio aquático (EPA, 2000; Sinha & Sinha, 2008). Pode ser aplicado em tratamento de águas residuais.

A fitorremediação é o método mais apropriado para o tratamento de grandes áreas de baixa a moderada contaminação, onde seria muito dispendioso aplicar um método convencional.

Comparativamente aos métodos físico-químicos convencionais, esta tecnologia aplicada *in situ* tem a vantagem de: ser rentável e economicamente viável; minimizar a destruição e destabilização do ecossistema recuperando-o; melhorar a paisagem; provocar baixo impacte ambiental; ser socialmente aceite; ser um método seguro com baixa exposição aos contaminantes (Mahar *et al.*, 2016; Sinha & Sinha, 2008).

Evitar a entrada dos contaminantes na cadeia alimentar é uma tarefa ingrata. Como a maioria dos contaminantes orgânicos não se acumulam significativamente nos tecidos das plantas, a grande preocupação reside nos compostos inorgânicos, nomeadamente nos metais, metaloides e elementos radioativos (EPA, 2000). Mesmo havendo a remoção das plantas hiperacumuladoras para locais de tratamento, há sempre algum consumo da parte aérea da planta e das raízes pelos organismos (EPA, 2000). A acumulação nas folhas, frutos e sementes geram maior exposição, pelo que a fitoestabilização é um processo que envolve menor risco de entrada dos poluentes na cadeia trófica, uma vez que limita maioritariamente o poluente à zona da raiz.

### **2.2.1. Processos de fitorremediação do Arsénio**

Os processos de fitorremediação mais recomendados para o tratamento de solos contaminados com As são a fitoestabilização e a fitovolatilização (EPA, 2000; Sinha & Sinha, 2008). No entanto, este elemento também pode ser removido por fitoextração e o As acumulado pode ser utilizado em aplicações industriais (Alkorta *et al.*, 2004; EPA, 2000).



#### 2.2.1.1. Plantas tolerantes e hiperacumuladoras de Arsénio

Existem vários estudos que identificaram espécies hiperacumuladoras de As, incluindo aquáticas, como por exemplo: *Pityrogramma calomelanos*, *Mimosa pudica*, *Melastoma malabathricum*, *Spergula arvenses*, *Leucaena leucocephala* e *Sesbania grandiflora*, *Corrigiola telephiifolia* (Anawar *et al.*, 2006; García-Salgado *et al.*, 2012; Visoottiviseth *et al.*, 2002). É de salientar os fetos como grandes hiperacumuladores (Anawar *et al.*, 2006), nomeadamente o *Pteris vittata*, pouco comum em Portugal continental, por ser uma espécie tropical, e que apresenta a capacidade de acumular 15861 mg kg<sup>-1</sup> de As, em duas semanas, num solo contaminado com 1500 mg kg<sup>-1</sup> de As (Ma *et al.*, 2001).

Na recuperação de uma área contaminada deve-se utilizar espécies autóctones, perfeitamente adaptadas às condições edafo-climáticas do local (Mendez & Maier, 2008).

Plantas arbustivas mediterrânicas como a *Erica andevalensis* e *Erica australis* mostraram serem tolerantes ao As e a valores de pH do solo entre 3,5 e 4, das zonas mineiras (Abreu *et al.*, 2009; Márquez-García *et al.*, 2012). Espécies como o *Cistus ladanifer*, *Daphne gnidium*, *Rumex induratus* e *Genista hirsutus* mostraram ser também tolerantes e foram indicadas como potenciais plantas fitoestabilizadoras devido ao seu porte arbustivo (Anawar *et al.*, 2011). A concentração de As nos tecidos destas plantas foi significativamente inferior ao presente no solo, apesar de exceder o limite tóxico para algumas plantas.

A capacidade de acumular quantidades acima dos valores considerados como limite de toxicidade para a maioria das plantas de metais e metaloides, como o As, permite eliminar a competição com plantas menos tolerantes através do desenvolvimento de uma estratégia para atingir a resistência a esses elementos, e pode resultar da absorção inadvertida de um metal ou metaloide quando o objetivo era um nutriente análogo.

#### 2.2.1.2. Potencial para a fitorremediação de espécies do género *Cistus*

Devido à sua grande tolerância a metais e metaloides, vários estudos têm sido realizados no sentido de estudar a viabilidade de algumas cistáceas serem utilizadas na fitorremediação, sobretudo em zonas mineiras mediterrânicas, onde são espontâneas (Fuente *et al.*, 2010).

A espécie mais estudada tem sido o *Cistus ladanifer*, identificada como sendo uma planta acumuladora de Zn (Abreu *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011) e com potencial para a fitoestabilização do Pb (Abreu *et al.*, 2009; Abreu *et al.*, 2011).

Têm sido realizados alguns estudos sobre a capacidade de *Cistus salviifolius* ser utilizado na fitorremediação. No entanto, num estudo conduzido por Pratas *et al.* (2014), verificou-se que esta espécie também acumula na parte aérea concentrações de Pb (548 mg kg<sup>-1</sup>) superiores a níveis tóxicos. Num outro estudo, verificou-se que esta planta, para além do Pb, apresentava concentrações de As e Zn superiores aos valores referenciados como fitotóxicos para a maioria das plantas, evidenciando a sua tolerância a estes elementos, não sendo, no entanto, acumuladora (Santos *et al.*, 2011). Noutra situação, esta espécie revelou uma tendência para translocar os nutrientes Cu, Mn e Zn para a parte aérea, e armazenar os elementos tóxicos como o As, Pb e o Sb nas raízes como possível mecanismo de exclusão que iniba a sua translocação quando acima de um determinado valor (Abreu *et al.*, 2012a). Já noutro estudo, a planta foi considerada acumuladora de Mn (Abreu *et al.*, 2012b).

De facto, estudos apontam para a possível utilização de *Cistus salviifolius* na fitoestabilização de áreas degradadas e contaminadas, como é o caso das áreas mineiras, devido à sua tolerância a concentrações elevadas de metais e metalóides, contudo, nada aponta que possa ser hiperacumuladora de algum destes elementos.

### **2.3. Stresse Oxidativo e mecanismos de remoção de ROS**

Todos os organismos vivos estão sujeitos a inúmeras condições adversas que podem provocar alterações fisiológicas. A estas alterações fisiológicas resultantes da produção intracelular excessiva e/ou acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS – *reactive oxygen species*) dá-se o nome de stresse oxidativo (Vansgroveld *et al.*, 1994). O stresse oxidativo nos seres vivos resulta de um desequilíbrio entre a produção de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante.

Quando as plantas estão sujeitas a condições desfavoráveis, o equilíbrio entre a produção de ROS e a sua eliminação é alterado, conduzindo a um aumento rápido das ROS ao nível intracelular (Anjum *et al.*, 2012; Apel & Hirt, 2004; Mittler, 2002).

O stresse oxidativo pode ser biótico, provocado por outros seres vivos, ou abiótico provocado por um fator ambiental, como o stresse mecânico, a radiação ultravioleta, a temperatura, a carência de nutrientes, défice hídrico, toxicidade de metais, elevada salinidade, entre outros (Apel & Hirt, 2004).

O superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), radicais hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) e singlete de oxigénio ( $^1O_2$ ), são exemplos de ROS, que são produzidos continuamente nas células como subprodutos do metabolismo aeróbio das plantas (respiração celular, fotorrespiração, oxidação de lípidos e fotossíntese) predominantemente em mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomas (Apel & Hirt, 2004). O  $H_2O_2$  e o  $O_2^{\cdot-}$  são espécies com reduzida reatividade que se formam em condições metabólicas estáveis, no entanto, os radicais hidroxilo e o singlete de oxigénio são espécies muito mais reativas que se formam apenas em condições de stresse. Os danos causados pelas ROS dependem da quantidade produzida de cada espécie, a reatividade e as moléculas sobre as quais atuam, o tempo de semivida, a distância percorrida na célula e o compartimento celular onde estão a ser produzidas.

O stresse oxidativo pode promover reações oxidativas como a peroxidação dos lípidos, oxidação proteica, inibição enzimática e danos no DNA e RNA. No limite, estas reações podem originar a morte celular, pelo que, o controlo da quantidade de ROS em cada compartimento é essencial para prevenir a sua toxicidade (Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004). As ROS podem agir provocando danos oxidativos ou como moléculas sinalizadoras que ativam respostas de defesa ao stresse biótico e ao stresse abiótico.

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa que combatem o stresse oxidativo provocado pela produção excessiva de ROS. Podem ser mecanismos antioxidantes enzimáticos e mecanismos não-enzimáticos (Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004). Na Figura 1 estão representados resumidamente os principais mecanismos de remoção das ROS.

Os principais mecanismos de remoção de ROS nas plantas são os mecanismos enzimáticos, em que as enzimas atuam de forma direta na remoção de ROS ou catalisam reações de formação e regeneração de moléculas para a retenção destas espécies. São exemplos destas enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), as peroxidases como a guaiacol peroxidase (GPOD), a glutathione peroxidase (GPX) e a ascorbato peroxidase (APX) (Mittler, 2002). Nas plantas, o maior sistema antioxidante envolve a ação da SOD, APX e CAT (Figura 1). A SOD atua na primeira linha de defesa contra as ROS, eliminando o  $O_2^{\cdot-}$  com a formação de  $H_2O_2$ , sendo este eliminado de seguida pelas outras enzimas. Estas enzimas são essenciais na diminuição do impacto do stresse oxidativo nas células (Apel & Hirt, 2004).

Nos mecanismos não enzimáticos, destacam-se a glutathione (GSH) e o ácido ascórbico (AsA), os flavonoides, tocoferol, alcalóides e carotenóides (Apel & Hirt, 2004).

A glutathione é um tripeptídeo ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinyl-glicina), que existe nos seres vivos nas suas formas reduzidas (GSH) e oxidada (GSSG) e que atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo na proteção celular, na síntese de proteínas e no metabolismo (Anjum *et al.*, 2012). Alterações na concentração deste tripeptídeo podem ser um indicador útil da existência de desordens fisiológicas

relacionadas com o stresse oxidativo. O stresse oxidativo pode causar mudanças no estado redox da glutathiona, aumentando a quantidade de glutathiona oxidada no organismo.

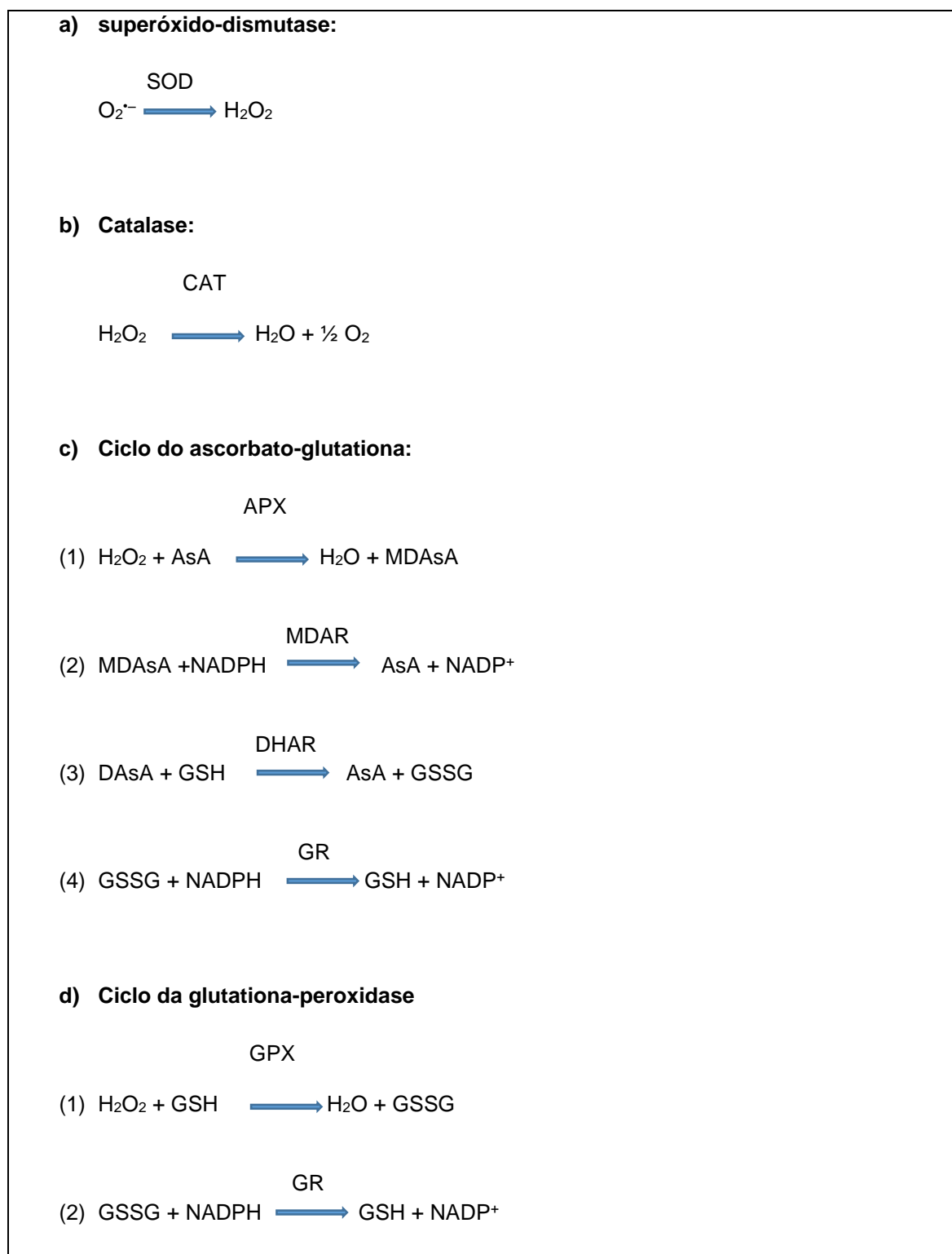


Figura 1 – Principais mecanismos de remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ : a) superóxido-dismutase (SOD); b) catalase (CAT), c) ciclo ascorbato-glutathiona e d) ciclo da glutathiona-peroxidase.

O ascorbato é um dos principais antioxidantes nas plantas, devido à sua capacidade de doar elétrons em reações enzimáticas e não enzimáticas. O ascorbato pode eliminar diretamente o  $O_2^{\cdot-}$ , os radicais hidroxilo e o singleto de oxigênio e, também reduzir o  $H_2O_2$  a água pela ação da enzima APX (Apel & Hirt, 2004).

Tanto a GSH como o AsA são encontrados em concentrações elevadas nos cloroplastos e outros compartimentos celulares, na ordem de 1–5 mM e 5–20 mM, respectivamente (Mittler, 2002). A GSH quando é oxidada por ROS dá origem a GSSG, enquanto o ascorbato é oxidado nas formas monodesidroascorbato (MDAsA) e desidroascorbato (DAsA) sendo ambos regenerados pelo ciclo ascorbato-glutationa (Apel & Hirt, 2004). A relação entre as formas reduzidas e oxidadas de ascorbato e de glutathione é essencial para a defesa de ROS nas células.

O ciclo ascorbato-glutationa compreende uma série de reações com o objetivo de remoção de  $H_2O_2$  (Figura 1). A enzima APX utiliza duas moléculas de AsA para reduzir  $H_2O_2$  a água, com a geração simultânea de duas moléculas de MDAsA. O MDAsA é um radical com vida curta e se não for rapidamente reduzido, converte-se em AsA e DAsA. O DAsA é reduzido a AsA pela ação da desidroascorbato redutase (DHAR), usando GSH como substrato para redução. Esta redução gera GSSG, que por sua vez é reduzida de novo a GSH pela glutathione redutase (GR), utilizando NADPH (Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato) (Anjum *et al.*, 2012, Apel & Hirt, 2004). A presença de GR nos cloroplastos garante a manutenção de níveis elevados de GSH, importante para a regeneração do AsA.

A GSH pode também atuar diretamente na redução do  $H_2O_2$ , através da ação da glutathione-peroxidase (GPX). A GSSG formada é reduzida utilizando NADPH como potencial redutor, sendo esta reação catalizada pela GR. Este processo é designado por ciclo glutathione-peroxidase (Figura 1).

### 3. Material e métodos

Ao longo deste trabalho foram realizados ensaios de germinação e de crescimento em hidroponia em diferentes condições (valores de pH e concentrações de As) para estudar o potencial efeito tóxico de As no desenvolvimento das plantas de *Cistus salviifolius* L., através das alterações fisiológicas daí resultantes.

Para avaliar o efeito do As nas plantas, para além da análise de crescimento (comprimento da raiz e parte aérea, massa seca e massa fresca total, da raiz e parte aérea, número de folhas, área foliar (AF) e razão da área foliar (RAF), fizeram-se diversas determinações analíticas tais como: teores de clorofila, quantificação de peróxido de hidrogénio, ascorbatos e glutatonas, e composição química das plantas.

#### 3.1. Material vegetal

Para a condução deste estudo, foram utilizadas sementes de *Cistus salviifolius* L. nos testes de germinação e jovens plantas da mesma espécie nos ensaios de hidroponia.

As sementes de *C. salviifolius* utilizadas foram cedidas pelo Laboratório de Geoquímica, do ISA. Foram recolhidas de plantas que cresciam em solos da área mineira de São Domingos, localizada no Baixo Alentejo, a Sul de Portugal, no final do Verão de 2010. As plantas usadas nos ensaios de hidroponia são provenientes do mesmo lote de sementes utilizadas nos ensaios de germinação.

##### 3.1.1. Caracterização da espécie em estudo: *Cistus salviifolius* L.

A espécie utilizada é o *Cistus salviifolius* L. (Figura 2), conhecida pelos nomes comuns de estevinha, sargaço, saganho-mouro, sanganho-mouro, sanganho-manso e sargaço-manso (Fernandes & Carvalho, 2003; Binagre *et al.*, 2007; Pedro & Santos, 1998).

É uma espécie angiospérmica que pertence à família Cistaceae e ao género *Cistus* que compreende pelo menos 18 espécies identificadas. A sua longevidade é de 15 anos.

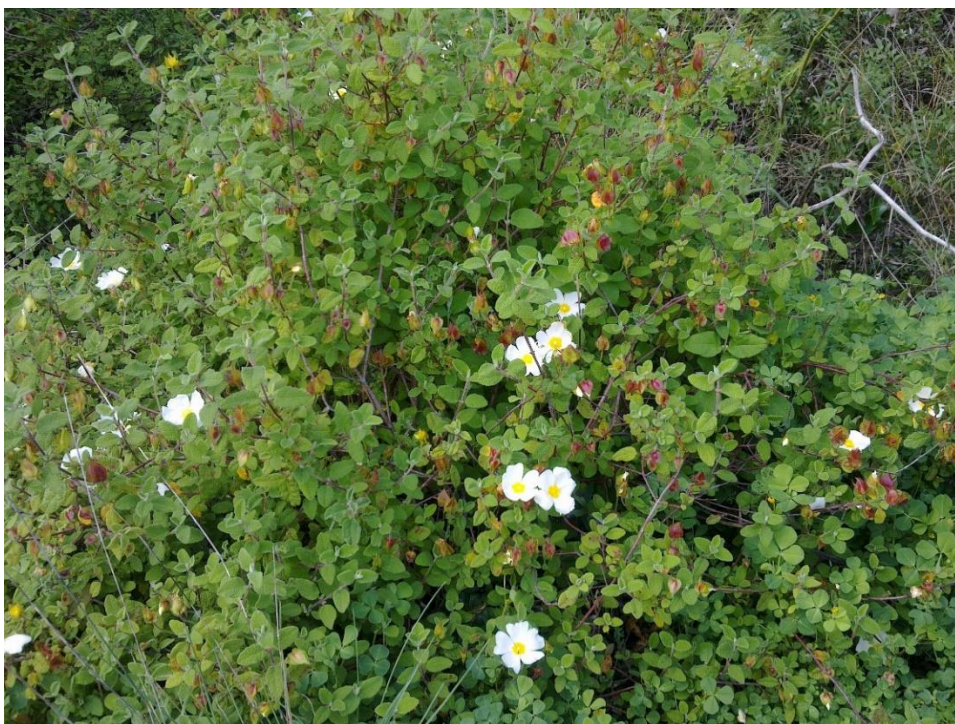


Figura 2 – Arbusto *Cistus salviifolius* L..

### 3.1.2. Descrição botânica

É um pequeno arbusto, entre 20 a 90 cm de altura, prostrado e ereto, muito ramificado, formando moita mais ou menos aberta (Castroviejo *et al.*, 1993; Franco, 1971).

As folhas (Figura 3a) são opostas pecioladas (pecíolo cilíndrico), penínérveas, verdes, rugosas e ásperas na página superior, não viscosas, com pêlos estrelados em ambas as faces, ovadas ou elípticas, arredondadas na base, com 10–40 x 6–20 mm, raramente com mais de 2 cm de comprimento (Binagre *et al.*, 2007; Castroviejo *et al.*, 1993; Franco, 1971; Pedro & Santos, 1998).



Figura 3 – a) Folhas de *Cistus salviifolius*; b) Flor de *Cistus salviifolius*.

As flores (Figura 3b) têm 3–5 cm de diâmetro, apresentam corola pentâmera com pétalas brancas (18–25 mm), cálice pentâmero, sépalas pubescentes (as externas cordiforme-ovadas e as internas ovadas), e a cápsula é tomentosa e truncada no cimo (6–8,5 x 7–9 mm) (Franco, 1971; Pedro & Santos, 1998). São geralmente solitárias, mas por vezes estão organizadas até quatro em cimeiras apicais paucifloras (Binagre *et al.*, 2007, Franco, 1971, Pedro & Santos, 1998). Floresce e frutifica de março a julho, podendo se prolongar até novembro (Carrascosa & Castrillón, 2008; González, 2007; Pedro & Santos, 1998; Moreira, 2008). A flor apenas dura um dia (Moreira, 2008).

As sementes têm 1 mm de diâmetro, são globosas e reticuladas (Castroviejo *et al.*, 1993). A sua propagação artificial pode ser feita através de sementes, alporquia ou por estaca. As sementes são recolhidas quando maduras, secas e armazenadas no máximo durante três anos. A germinação ocorre geralmente de entre uma a quatro semanas, à temperatura de 20 °C. Forma híbridos com outras espécies de *Cistus*, tendo sido propostas novas variedades (Binagre *et al.*, 2007; Castroviejo *et al.*, 1993; Franco, 1971).

### 3.1.3. Distribuição e habitat

O seu habitat cobre quase toda a Península Ibérica e Ilhas Baleares, e está espalhada em grande parte da zona mediterrânica (Sul da Europa, Norte de África e Sudoeste da Ásia), desde do nível do mar até 1100–1800 m de altitude (Castroviejo *et al.*, 1993; González, 2007; Pedro & Santos, 1998). Em Portugal, distribui-se por todo o território continental e Madeira, exceto no Minho montanhoso e na Serra da Estrela (Binagre *et al.*, 2007; Pedro & Santos, 1998).

É possível encontrá-la em locais secos, ensolarados e em solos de qualquer natureza (Castroviejo *et al.*, 1993; González, 2007). Contudo, é mais frequente em matos xerófilos baixos e solos desenvolvidos sobre rochas ricas em silício, em pinhais, montados, sobreirais e azinhais densos, prados abandonados, clareiras dos matos, etc. (Binagre *et al.*, 2007; Carrascosa & Castrillón, 2008; Guittonneau & Huon, 1992; Pedro & Santos, 1998).

É uma espécie pioneira, conhecida por dominar na primeira fase de sucessão ecológica, principalmente quando surge um incêndio, pois as altas temperaturas quebram a dormência das suas sementes (Borges & Almeida, 1992; Moreira *et al.*, 2012; Moretti *et al.*, 2008). Para além disso, pode ser utilizada na regeneração da vegetação natural de um local, pois incrementa a quantidade de nutrientes no solo, favorecendo a presença de plantas mais exigentes contribuindo para a biodiversidade do ecossistema (Simões *et al.*, 2009).

É habitual encontrá-la em áreas mineiras à semelhança de outras cistaceas (Fuente *et al.*, 2010; Abreu *et al.*, 2012a), indicando que está perfeitamente adaptada a baixos valores



de pH e a elevadas concentrações de elementos potencialmente tóxicos aí existentes, o que, aliado ao facto de sobreviver à xericidade estival, em terrenos pobres em nutrientes e à sua capacidade colonizadora, a torna numa espécie potencial para a fitorremediação.

### 3.2. Germinação

Inicialmente, foi realizado um breve ensaio onde se avaliou a capacidade de germinação de *C. salviifolius* em soluções aquosas com diferentes valores de pH apenas na gama ácida. Posteriormente, foi feito um ensaio com maior detalhe na análise da capacidade de germinação em soluções com diferentes concentrações de As, semelhantes às que estão presentes nos solos contaminados por este metaloide.

As sementes utilizadas nos testes de germinação foram submetidas à temperatura de 100 °C, durante 10 minutos, numa estufa, para quebrar a dormência. Depois, foram desinfetadas com o uso de solução de hipoclorito de sódio a 5% (durante 5 minutos num agitador a 300 rpm), e em seguida, lavadas com água desionizada (Mili-Q). Posteriormente, foram colocadas 25 sementes viáveis, aproximadamente equidistantes, em cada placa de Petri (11 cm Ø), sobre três folhas de papel de filtro Whatmann n.º 1, autoclavado e bem humedecido com solução aquosa (5 mL) de acordo com o tratamento a testar, e que se manteve húmido durante todo o ensaio com essa solução. Para cada tratamento, foram feitas quatro repetições.

As placas com as sementes foram colocadas a germinar em sala de germinação com fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro, à temperatura de 25/22 °C, sob iluminação fluorescente branca contínua com a irradiância de  $50 \pm 5 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 4).

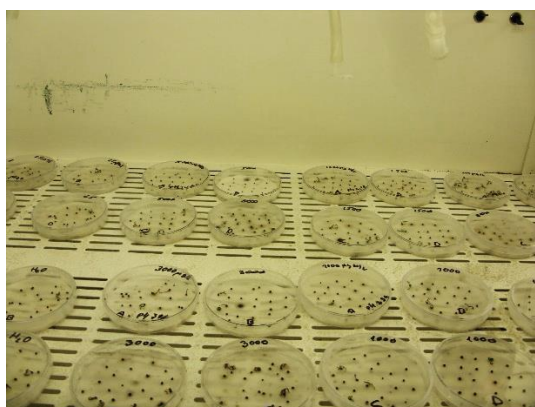


Figura 4 - Ensaio de germinação de *C. salviifolius* em diferentes soluções aquosas

Considerou-se germinada a semente que apresentou emergência aproximada de 1 mm da radícula. Considerou-se o comprimento do caule da plântula a distância medida entre a base do hipocótilo até ao topo dos cotilédones ou até ao último par de folhas novas, se estas já tivessem surgido.

Na análise dos dados, foi calculada a capacidade germinativa média acumulada ao longo do período do ensaio. Esta variável corresponde à média da taxa germinativa em cada momento para cada um dos tratamentos. Foram também quantificados os parâmetros  $t_0$  (número de dias até a primeira semente germinar) e  $t_{50}$  (número de dias necessários para alcançar 50% da taxa de germinação final).

### **3.2.1. Teste de germinação de *C. salviifolius* em soluções aquosas com diferentes valores de pH**

Com o objetivo de conhecer a aptidão de *C. salviifolius* germinar em ambientes ácidos, comuns em áreas degradadas, foi feita uma avaliação da sua capacidade de germinação em soluções com diferentes valores de pH ácido, 2,5, 3, 4, 5 e 6 e o controlo, durante 21 dias. As soluções com diferentes valores de pH foram obtidas a partir da diluição de uma solução mãe de ácido sulfúrico com água desionizada (Mili-Q). A solução de controlo foi composta apenas por água desionizada, apresentando na altura pH 7,2.

Foi observado e registado o número de sementes germinadas de dois em dois dias. Findo o período experimental de 21 dias, a raiz, o caule e a folha maior das plântulas foram medidos, utilizando papel milimétrico.

### **3.2.2. Teste de germinação de *C. salviifolius* em soluções aquosas com diferentes concentrações de As**

Procedeu-se à avaliação da capacidade de germinação de *C. salviifolius* em soluções com as seguintes concentrações de As: 0, 25, 100, 500, 1000, 1500, 3000 e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . As soluções de As foram preparadas a partir da diluição do composto hidrogenoarsenato de sódio heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) em água desionizada (Mili-Q), e aferidas a pH 4 com ácido sulfúrico 1 M.

Foi observado e registado o número de sementes germinadas em cada três ou quatro dias, durante 30 dias. Findo este período, a raiz, o caule e a folha maior das plântulas foram medidos, utilizando papel milimétrico. A raiz e a parte aérea (caule e folhas) foram

pesadas e colocadas na estufa à temperatura de 60 °C, até obtenção de massa constante, sendo pesadas novamente para obtenção da biomassa (massa seca), numa balança analítica (METTLER - AE260, com precisão 0,0001 g).

Com base na massa fresca e na massa seca, foi determinado o teor de água (fração de água livre) através da seguinte equação:

$$W = \frac{Massa\ fresca - Massa\ seca}{Massa\ fresca} \times 100 \quad (\%)$$

### 3.3. Efeito de diferentes concentrações de As nos tratamentos em hidroponia

#### 3.3.1. Obtenção das plantas

As sementes foram submetidas ao mesmo pré-tratamento indicado para os ensaios da germinação, mas neste caso, foram colocadas cinco sementes em cada tubo *ependorf* de 1,5 mL, com o fundo cortado e sem tampa, contendo lã de rocha, num total de 100 *ependorfs*. A germinação ocorreu num sistema de hidroponia passiva numa solução com água desionizada e ajustada a pH 4 com ácido sulfúrico (1 M), numa câmara de germinação, com humidade a 70%, à temperatura de  $25 \pm 2$  °C, sob irradiância de  $150 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16/8 horas.



Figura 5 - Crescimento em hidroponia de plantas de *C. salviifolius* com ~3 cm.

Após quinze dias de crescimento, quando as plantas apresentavam aproximadamente 2 cm de comprimento da parte aérea, foram colocadas num sistema de hidroponia, com arejamento forçado obtido através de uma bomba de aquário, com a solução nutritiva (Quadro II) ajustada a pH 4, numa sala de germinação, à temperatura de

25 ± 2 °C, sob irradiância de 100 µmol quanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16/8 horas. Quando apresentavam cerca de 3 cm de altura (Figura 5), foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho e forma, dando-se início ao ensaio de hidroponia em solução nutritiva com concentrações diferentes de As.

Quadro II – Composição e concentração das soluções padrão da solução nutritiva para cultivo de *Cistus* sp. (Rossini *et al.*, 2010).

Componentes	g L <sup>-1</sup>	Volume, em mL, de solução padrão para 1 L
1 – Solução <i>stock</i> LA (SS1):		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,1 M)		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (0,1 M)	13,6090	
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (1 mM)	24,6480	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,2490	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0240	10,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0296	
(NH <sub>4</sub> )Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	0,1860	
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0035	
Sequestrene 138 Fe	0,0028	
	4,0000	
2 – Solução <i>stock</i> Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (1,0 M) (SS2)	236,1500	2,0
3 - Solução <i>stock</i> K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,5 M) (SS3)	174,2700	3,0
4 - Solução <i>stock</i> NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (1,0 M) (SS4)	80,0400	1,0
Os componentes foram adicionados na ordem listada. O volume foi completado com água destilada. O pH foi ajustado para 4 com uma solução diluída de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1:10).		

### 3.3.2. Aplicação dos tratamentos

Inicialmente, foi realizado um ensaio em hidroponia (Ensaio I), com arejamento, utilizando a solução nutritiva (Quadro II) e aplicando quatro tratamentos com As, na forma de Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Hidrogenoarsenato de sódio heptahidratado), nas concentrações de 0,0 (controle), 500, 1500 e 5000 µg L<sup>-1</sup>. As soluções foram ajustadas para pH 4 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Posteriormente, foi realizado um segundo ensaio (Ensaio II) em hidroponia exatamente nas mesmas condições e com o mesmo procedimento, mas aplicando concentrações mais elevadas de As, de 20000 e 30000 µg L<sup>-1</sup>, e um novo controle (0,0 µg As L<sup>-1</sup>).

O procedimento experimental decorreu na sala de crescimento, localizada nas instalações do Horto de Química Agrícola ISA, à temperatura de 25 ± 1 °C, sob irradiância

de  $130 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e fotoperíodo luminoso de 12/12 horas, durante todo o período de crescimento em hidroponia com arejamento. Os ensaios tiveram uma duração total de 30 dias. Decorridos dez e vinte dias de crescimento em hidroponia, as soluções de tratamento foram substituídas por outras idênticas.

Em ambos os ensaios, foram colocadas inicialmente treze plantas em cada solução de tratamento (Figura 6). Destas plantas, cinco permaneceram na solução durante trinta dias, quatro foram removidas no décimo e outras quatro no vigésimo dia de tratamento.



Figura 6 – Início do primeiro ensaio de hidroponia de plantas de *C. salviifolius* em diferentes tratamentos de As (controle, 500, 1500 e  $5000 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

No dia zero do ensaio, foram retiradas seis plantas do mesmo lote das utilizadas nos diferentes tratamentos de hidroponia. Depois de lavadas com água desionizada, separou-se a parte aérea da raiz e pesou-se cada uma das partes. Três plantas foram utilizadas para quantificação de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ascorbatos e glutatonas. Essas três e mais uma planta foram também usadas na determinação de clorofilas. As outras duas plantas foram colocadas a secar em estufa convencional, à temperatura de  $60^\circ\text{C}$  até se atingir massa constante, para determinação da massa seca.

Ao fim de dez e vinte dias foram retiradas quatro plantas, que foram imediatamente congeladas em azoto líquido e conservadas a  $-80^\circ\text{C}$  para análise de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ascorbatos e glutatonas.

No final do ensaio foram retiradas as cinco plantas que permaneceriam em cada tratamento durante trinta dias. Quatro delas foram utilizadas para quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ascorbatos, glutatonas e clorofilas. A restante planta foi colocada a secar em estufa convencional, à temperatura de  $60^\circ\text{C}$ , até a obtenção da massa constante, para determinação da massa seca.

A quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ascorbatos, glutatonas e clorofilas não se realizou em plantas mortas no decorrer dos ensaios, o que se verificou nas concentrações 20000 e  $30000 \mu\text{g As L}^{-1}$ .

Nas cinco plantas escolhidas para permanecer até ao final dos ensaios, foram medidos o comprimento da raiz, da parte aérea, a maior largura e o maior comprimento sempre da mesma folha, a massa fresca e o número de folhas, no tempo zero, dez, vinte e trinta dias.

Todas as plantas após a remoção foram pesadas com o *eppendorf*, separadas em raízes e parte aérea, lavadas com água desionizada, e pesadas novamente. O respetivo *eppendorf* e a lâ de rocha que o preenche também foram pesados para subtração da massa total.

As dimensões e pesagens de cada planta foram obtidas com auxílio de um paquímetro digital (precisão de 0,01 mm) e de uma balança analítica (precisão 0,01 g).

Foram ainda determinados o teor em elementos químicos (macro e micro nutrientes, e As) em plantas (entre duas e cinco por tratamento) removidas no final do ensaio, incluídas as mortas.

### **3.3.3. Determinação da composição química das plantas**

Os elementos químicos quantificados foram, para além do As, os seguintes macronutrientes: Ca, Mg, Mn, K, e P; e os seguintes micronutrientes: Zn, Cu, e Fe.

As amostras da parte aérea e da raiz das plantas, no final da experiência (trinta dias) foram secas a 60 °C na estufa, até obter uma massa constante da matéria seca. De seguida procedeu-se à sua moenda manual para posterior digestão por micro-ondas. A digestão das amostras por micro-ondas é um método rápido, devido às altas temperaturas e pressões a que são submetidas, em que o carbono presente na matéria orgânica da amostra é libertado sobre a forma de dióxido de carbono, havendo também a libertação de vapor de água e de outros gases.

Para realizar a digestão, as amostras secas e moídas foram transferidas para tubos de teflon adequados ao equipamento de micro-ondas (CEM MDS 2000), pesadas e diluídas em 5 mL de ácido nítrico concentrado. Preparou-se um tubo com uma amostra padrão da planta (NCb DC 73348 Bush branches and leaves) para controlo à qual se adicionou igualmente 5 mL de ácido nítrico, e um outro tubo com apenas 5 mL de ácido nítrico (branco). Foi colocada uma rosca grande em cada tubo, com uma pequena abertura no centro, e estes foram encaixados no carrossel (máximo de 12 tubos). Sobre a abertura da rosca grande, foi encaixada uma rosca mais pequena que possui uma membrana de teflon (permite reduzir a pressão no tubo), onde por sua vez, é enroscado um tubo com ligação ao aparelho.

Procedeu-se à digestão no micro-ondas à potência máxima (650W), utilizando um programa com três fases de pressão (45 Psi durante 6 minutos, 90 Psi a 6 minutos e a 150 Psi por 10 minutos), com a duração aproximada de 45 minutos. Após a digestão, na *hotte* (perigo de libertação de gases contendo ácido nítrico), diluíram-se as amostras em balões volumétricos de 10 mL com água desionizada, ficando guardadas à temperatura ambiente. Os extratos assim obtidos foram posteriormente utilizados na determinação dos elementos químicos num espectrofotómetro de absorção atómica (EAA) em câmara de grafite, no Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro.

### **3.3.4. Análise de crescimento**

A análise de crescimento tem como objetivo descrever e interpretar a performance de *C. salviifolius*, em meio controlado, em que a variável independente é o As. A medição da largura e comprimento da folha, a contagem do número de folhas, a medição do comprimento das raízes e da parte aérea, e da massa fresca total foram feitas em cinco plantas de cada tratamento e controlo, ao fim de zero, dez, vinte e trinta dias de tratamento, nos dois ensaios realizados. Com os dados das dimensões foliares, da massa seca total e massa fresca procedeu-se aos cálculos do teor de matéria seca (MS), área foliar e razão de área foliar (RAF), que caracterizam o crescimento e são descritos nos pontos que se seguem.

#### **3.3.4.1. Determinação da área foliar (AF)**

A folha é um órgão essencial para a fotossíntese, respiração e transpiração, sendo a área foliar um indicador da eficiência fotossintética, necessária ao crescimento e manutenção da planta, útil na avaliação de danos bióticos e abióticos. O conhecimento da área foliar durante todo o período experimental é importante para que se possa analisar o crescimento vegetal e o desenvolvimento das plantas sujeitas a diferentes concentrações de As.

Na determinação da área foliar utilizou-se um método não destrutivo e indireto, simples, rápido e que permite acompanhar ao longo do tempo o crescimento e expansão foliar sempre da mesma folha numa determinada planta, utilizando parâmetros dimensionais da folha que apresentam uma boa correlação com a área foliar.

A área foliar (AF) foi determinada em cinco repetições de cada tratamento e do controlo, a partir das medições da parte mais larga da folha (maior distância perpendicular à

nervura principal) e do seu comprimento máximo (distância medida entre o ponto de inserção do pecíolo e a extremidade oposta), ambos em mm, utilizando uma régua. Estas medições foram realizadas sempre na mesma folha (uma folha do segundo par). A estes dados biométricos aplicou-se a seguinte equação da elipse (Amazonas *et al.*, 2008, Nakamura *et al.*, 2005):

$$AF = \text{Área da elipse} = \pi \times a \times b = \frac{\pi}{4} \times L \times C = 0,785 \times L \times C \quad (\text{cm}^2)$$

Em que,  $a$  e  $b$  são respetivamente os semi-eixos maior e menor da elipse,  $L$  a largura e  $C$  o comprimento da folha. O factor  $\frac{1}{4}$  que surge na equação deve-se ao facto de que, neste caso, os semi-eixos são metade do comprimento ( $a = C/2$ ) e metade da largura ( $b = L/2$ ).

A equação utilizada é uma boa aproximação ao valor da área foliar devido à forma aproximadamente elíptica das folhas desta espécie (apesar da base da folha ser ligeiramente mais larga do que a ponta). Contudo, isto não inviabiliza a necessidade de determinar uma equação característica para esta espécie que, através de parâmetros lineares dimensionais do limbo foliar, permita uma melhor estimativa da área foliar, obtida através de estudos de regressão da relação entre a área foliar real e esses parâmetros, de forma semelhante ao que já tem sido feito para outras espécies (Ghoreishi *et al.*, 2012; Maldaner *et al.*, 2009; Ramesh *et al.*, 2007; Williams & Martinson, 2003).

#### 3.3.4.2. Razão de área foliar (RAF)

A razão de área foliar (RAF) expressa a área foliar útil para a fotossíntese. É a razão entre a AF (área responsável pela absorção de luz e do dióxido de carbono) e a massa seca total (resultado da fotossíntese líquida), ou seja, a RAF é a área foliar em  $\text{m}^2$  que é usada para produzir 1 g de massa seca. Foi determinada para cada concentração de As (0, 500, 1500 e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), no início ( $n=4$ ) e no final da experiência ( $n=1$ ), utilizando a equação:

$$RAF = AF/MS_{Total} \quad (\text{m}^2 \text{ g}^{-1})$$

Em que:

AF é a média da área foliar das plantas sujeitas a cada concentração de As,

$MS_{Total}$  é a média da massa seca total das plantas em cada concentração de As.



### 3.3.5. Determinação das Clorofilas

O teor dos pigmentos fotossintéticos, clorofilas, é um indicador da eficiência fotossintética de plantas e da sua resposta a condições de stresse, e consequentemente, do crescimento e da adaptabilidade a diversos ambientes.

A quantificação das concentrações de clorofilas *a* e *b* foi efetuada utilizando uma folha do segundo par em quatro plantas no início do ensaio, e em quatro plantas por tratamento no final do ensaio em hidroponia (trinta dias), que foram imediatamente congeladas em azoto líquido e armazenadas no congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  até à data da análise.

Todas as folhas foram previamente pesadas antes de submetidas à extracção de clorofilas pelo método de Hiscox (Hiscox & Israelstam, 1979). Este método é um método destrutivo, em que cada folha foi mergulhada em 2 mL de DMSO (dimetilsulfóxido,  $\text{C}_6\text{H}_6\text{OS}$ ), num tubo de ensaio, incubados a  $65^{\circ}\text{C}$ , durante aproximadamente uma hora, considerando-se o processo de extracção completo, quando as folhas se tornaram visualmente transparentes.

As absorvâncias dos extratos arrefecidos foram lidas no espectrofotómetro (UV/VIS SPECTROPHOTOMETER SHIMADZV, UV-Mini 1240), nos comprimentos de onda 645, 663 e 470 nm, e aplicaram-se as seguintes equações de Arnon (1949) para determinar as concentrações das clorofilas em g por litro de extrato ( $\text{g L}^{-1}$ ) (Richardson *et al.*, 2002):

$$\text{Clorofila } a = 0,0127 \times A_{663} - 0,00269 \times A_{645} \quad (\text{g L}^{-1})$$

$$\text{Clorofila } b = 0,0229 \times A_{645} - 0,00468 \times A_{663} \quad (\text{g L}^{-1})$$

$$\text{Clorofila total} = 0,0202 \times A_{645} - 0,00802 \times A_{663} \quad (\text{g L}^{-1})$$

Em que, A é a absorvância medida no comprimento de onda indicado.

Os resultados foram convertidos em mg de clorofila por área foliar ( $\text{mg cm}^{-2}$ ). Foi determinada a razão entre clorofila *a/b*.

Este método tem a vantagem de ser rápido, sobretudo porque a maceração e a centrifugação não são necessárias, e por o extrato da clorofila em DMSO ser mais estável podendo ser armazenado para posterior análise (Richardson *et al.*, 2002).

### **3.3.6. Quantificação de peróxido de hidrogénio, ascorbatos e glutathionas**

#### **3.3.6.1. Extração**

A amostra, planta dividida em raiz e parte aérea, recolhida a cada dez dias nos ensaios de hidroponia, foi pesada, imediatamente congelada em azoto líquido e armazenada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até à data da preparação do seu extrato. Para tal, adicionou-se à amostra previamente moída em almofariz, 750  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 6% de ácido metafosfórico frio (pH 2,8) e 1 mM de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA), seguindo-se a sua centrifugação durante 5 minutos a 27000  $g$  após breve agitação num *vortex* (Anderson *et al.*, 1992).

O extrato ácido preparado foi conservado à temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até ser utilizado na quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ascorbatos e glutathionas.

#### **3.3.6.2. Determinação do peróxido de hidrogénio**

O método utilizado na determinação da concentração de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi baseado no método descrito por Jiang *et al.* (1990), que assenta no princípio de que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxida o Fe(II) a Fe(III), o qual reage com o xilenol laranja, produzindo um cromóforo que tem absorção máxima a 560 nm. Este método produz resultados fiáveis no intervalo de 0,1 a 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Para a determinação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  adicionou-se a 300  $\mu\text{L}$  de extrato de amostra 15  $\mu\text{L}$  de carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) 5 M, para neutralizar o extrato a pH 7,5. Seguidamente, acrescentou-se 300  $\mu\text{L}$  da mistura de reação composta por: sulfato de amónio ferroso  $[(\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})]$  a 500  $\mu\text{M}$ ; ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a 50 mM; xilenol laranja ( $\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{Na}_4\text{O}_{13}\text{S}$ ) a 200  $\mu\text{M}$ ; e sorbitol ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ ) a 200 mM. Após 45 minutos de incubação à temperatura ambiente, a absorvância deste preparado foi lida no comprimento de onda de 560 nm, num leitor de microplacas (Bio-Tek, Synergy HT). Foram feitas duas leituras por amostra.

A quantificação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi feita a partir da elaboração de uma curva padrão, para o traçado da qual foram utilizadas seis concentrações 0,0; 0,5; 5, 0; 20,0; 30,0 e 50,0  $\mu\text{M}$ , obtidas por diluição seriada da mesma solução *stock*. A equação da reta de regressão linear da curva padrão obtida tem a forma:

$$y = 0,0024x + 0,5503 \quad R^2 = 0,8682$$

Em que, y é a absorvância lida e x a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a estimar. Foram feitas três leituras para cada concentração.

### 3.3.6.3. Determinação dos ascorbatos

Os ascorbatos foram determinados pelo método descrito por Okamura (1980). Segundo este método, num *ependorf*, 75 µL do extrato ácido da amostra foi neutralizado com 15 µL de trietanolamine a 1,5 M. Depois de homogeneizar, adicionou-se 90 µL do tampão fosfato de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a 150 mM (pH 7,4).

Para a determinação do ascorbato total adicionou-se 45 µL de ditione (DTT) a 10 mM, seguindo-se 15 minutos de incubação a 25 °C para se dar a reação de redução do ascorbato oxidado (DAsA) presente no extrato. Para remover o excesso de DTT, adicionou-se 45 µL de N-etilmaleimida a 0,5% (m/V). As amostras foram homogeneizadas e incubaram durante 30 s a 25 °C.

Para a quantificação do ascorbato reduzido (AsA), adicionou-se água em vez do DTT e da N-etilmaleimida, para que os volumes de ambas as amostras fossem iguais.

Para as duas amostras (ascorbato total e AsA) foram adicionados sucessivamente os seguintes reagentes pela ordem indicada: 180 µL de ácido tricloroacético (CCl<sub>3</sub>COOH) a 10% (m/V), 180 µL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a 44% (V/V), 180 µL de 2,2'-dipiridil (C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>) a 4% (m/V) em 70% de etanol e 90 µL cloreto de ferro férrico (FeCl<sub>3</sub>) a 3% (m/V). Depois de homogeneizar, as amostras foram incubadas a 37 °C pelo período de 1 hora. Procedeu-se à leitura da absorvância a 525 nm no leitor de microplacas (Bio-Tek, Synergy HT), realizando duas repetições por amostra.

Traçou-se a curva padrão da concentração do ascorbato reduzido a partir das concentrações 0,0; 0,1; 0,25; 0,5; e 0,75 mM de ácido ascórbico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>) e respectivas absorvâncias a 525 nm. Da regressão linear obteve-se a seguinte equação da reta que permitiu determinar as concentrações de ascorbato:

$$y = 1,039x + 0,1614 \quad R^2 = 0,9243$$

em que, y é a absorvância lida e x a concentração de AsA ou ascorbato total a estimar. Foram feitas três leituras para cada concentração.

A concentração de DAsA foi calculada subtraindo ao ascorbato total o valor de AsA. Os dados foram apresentados na percentagem de redução que corresponde à percentagem de total de ascorbato presente como AsA e é definida como: AsA / (AsA + DAsA) x 100.

### 3.3.6.4. Determinação de glutathiona

A glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram analisadas colorimetricamente pelo método descrito por Anderson *et al.* (1992), que consiste no seguinte: o volume de 12,5 µL de extrato ácido da amostra foi diluído em 612,5 µL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 5% (pH 7,5), este, por sua vez, foi dividido em dois, a fração onde se quantificou a GSSG foi incubada 1 hora a 25 °C com 12,5 µL de 2-vinylpiridina na *hotte* e a fração para quantificação de glutathiona total ficou inalterada; de seguida foram adicionados a 100 µL de cada fração 100 µL de Reagente 1 (EDTA 15 mM, *Ellman's Reagent* 0,3 mM, BSA (albumina do soro bovino) 0,04%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 110 mM e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 40 mM) e 80 µL de Reagente 2 (EDTA 1 mM, imidazole 50 mM e BSA 0,02%). A absorvância dos brancos foi lida num leitor de microplacas (Bio-Tek, Synergy HT) no comprimento de onda de 412 nm, após o que se adicionou 20 µL de NADPH (Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato) 9,0 mM. A leitura final, também a 412 nm, foi efetuada 90 minutos depois.

As concentrações de glutathiona total, de GSH e de GSSG foram expressas nas unidades µmol g<sup>-1</sup> de massa fresca. A GSH foi determinada pela diferença entre a glutathiona total e GSSG. Os dados foram apresentados na percentagem de redução que corresponde à percentagem de total de glutathiona presente como GSH e é definida como:  $GSH / (GSH + GSSG) \times 100$ .

## 3.4. Tratamento estatístico

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente utilizando o programa de estatística "SPSS Statistics 17.0" (SPSS Inc.).

As médias dos resultados foram analisadas estatisticamente a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) através do teste paramétrico ANOVA *One-way* (análise de variância a um factor), seguido do teste de comparação múltipla (*post-hoc*) H.S.D. de Tukey, sempre que se verificou a normalidade das distribuições (teste de Kolmogorov-Smirnova com a correcção de Liliefors e de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade das variâncias (teste de Levene). Quando estes pressupostos não se verificaram, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Se existirem diferenças significativas entre as médias, as variáveis dependentes foram convertidas, procedendo-se à aplicação do teste paramétrico ANOVA *One-way*, a esses novos dados transformados, com a comparação múltipla das médias pelo método LSD (Least Significant Difference) de Fisher, com o nível de significância de  $p < 0,05$ .

Para a comparação de duas médias utilizou-se o teste *t*-Student quando se verificou a normalidade, também a um nível de confiança de 95%, Caso a normalidade das distribuições seja violada aplicou-se o teste não-paramétrico de Wicoxon-Mann-Whitney.

Letras diferentes indicam que há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias. As barras de erro das colunas em alguns gráficos correspondem ao desvio-padrão (DP) das médias (M) das amostras. Nos quadros a média precede o desvio-padrão ( $M \pm DP$ ).

Nas situações em que só existiu um único dado por tratamento ( $n=1$ ), na análise da massa seca e da RAF, não foi aplicada a análise estatística supradescrita.

Para avaliar a correlação das concentrações de As com as dos elementos químicos nas raízes e na parte aérea, e também com as variáveis fisiológicas, foi utilizado o teste não paramétrico do coeficiente de correlação ordinal de Spearman por não se verificar a normalidade das distribuições, tendo-se considerado apenas os valores de  $r$  superiores a 0,80 e os níveis de significância de 0,05 e 0,01.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Germinação

Foram realizados dois testes de germinação, num dos quais foram testadas gamas de pH (2,5, 3, 4, 5 e 6 e o controlo) durante 21 dias, e no outro, em que se testou a concentração de As (0, 25, 100, 500, 1000, 1500, 3000, e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) durante 30 dias. Em ambos os testes de germinação verificaram-se níveis diferentes de desenvolvimento da plântula de *C. salviifolius* no mesmo tratamento (Anexos I e III). A Figura 7 ilustra essa heterogeneidade observada no tratamento de 1500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As e na Figura 8 é também possível observar diferentes estados de desenvolvimento das plântulas no tratamento com pH 4.

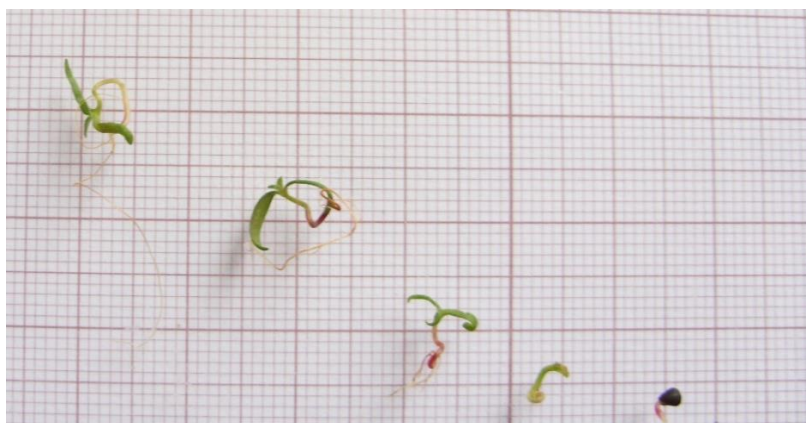


Figura 7 – Desenvolvimento das plântulas resultantes da germinação das sementes submetidas ao tratamento de As com a concentração de 1500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , existentes na mesma placa de germinação, ao fim de 30 dias.



Figura 8 – Desenvolvimento das plântulas resultantes da germinação das sementes submetidas ao tratamento com pH 4, existentes na mesma placa de germinação, após 21 dias.

No final do ensaio observou-se em ambos os testes de germinação que a raiz desenvolvida era primária, salvo raras exceções em que se desenvolveram raízes secundárias. O número de folhas desenvolvidas foi geralmente de um par (folhas cotiledonares), surgindo raramente dois pares.

#### **4.1.1. Teste de germinação de *C. salviifolius* em soluções aquosas com diferentes valores de pH**

Para utilizar uma espécie vegetal como potencial instrumento de fitoestabilização em locais contaminados com As, para além da necessidade de conhecer o crescimento dessa espécie em ambientes com elevadas concentrações de As, é igualmente importante verificar se a planta tem capacidade de germinar no local onde está instalada, sem recorrer ao repovoamento. Por isso, foi realizado um breve ensaio onde se avaliou a capacidade de germinação de *C. salviifolius* em soluções aquosas com valores de pH ácidos, pois a maioria dos meios contaminados por As apresentam valores de pH na gama ácida. Um dos motivos de escolha desta espécie foi a sua preferência por ambientes desta natureza.

No Anexo I pode-se observar o resultado final do teste de germinação de *C. salviifolius* em soluções com diferentes valores de pH.

A Figura 9 mostra o efeito do pH sobre a germinação de sementes de *C. salviifolius* ao longo de 21 dias. Ocorreu a germinação em todas as soluções com valores diferentes de pH, e como seria de esperar, o número de sementes germinadas aumentou ao longo do tempo em todos os tratamentos, sendo mais acentuado entre o dia 18 e o dia 21. A maior taxa de germinação ocorreu na solução com pH 5 (45%), e a menor na solução com pH 3 (20%), existindo diferenças significativas (Anexo II).

Curiosamente, o  $t_0$  (tempo decorrido até ao início de germinação de sementes) foi menor nas sementes submetidas a soluções com o pH mais baixo (2,5) e nas submetidas a soluções de pH mais alto (7,2 – o controlo), com diferenças significativas em relação às restantes. As duas curvas da variação da taxa de germinação acumulativa nestas duas soluções foram relativamente semelhantes ao longo do tempo. O mesmo ocorreu no tempo decorrido até alcançar 50% da taxa de germinação final ( $t_{50}$ ), sendo este também semelhante na solução com pH 3 (Quadro III).

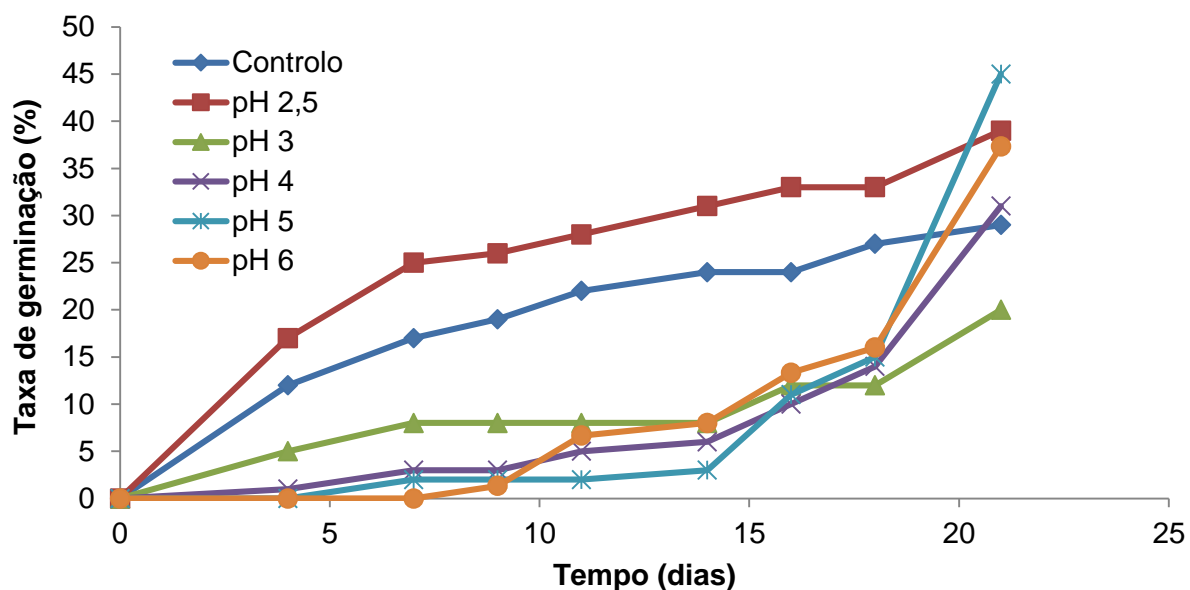


Figura 9 – Variação da taxa de germinação acumulativa (%) das sementes de *C. salviifolius* em tratamentos com diferentes valores de pH, ao longo de 21 dias.

Nota: valores e diferenças significativas no Anexo II.

Quadro III – Valores médios e desvios-padrão do tempo decorrido até ao início da germinação das sementes de *C. salviifolius* ( $t_0$ ) e do tempo decorrido até alcançar 50% da taxa de germinação final ( $t_{50}$ ), obtidos experimentalmente para soluções aquosas com diferentes valores de pH.

Tratamento	$t_0$ (dias)	$t_{50}$ (dias)
Controlo	$4 \pm 0$ a	$8 \pm 3$ a
pH 2,5	$4 \pm 0$ a	$6 \pm 2$ a
pH 3	$10 \pm 7$ b	$13 \pm 9$ ab
pH 4	$7 \pm 3$ a b	$22 \pm 5$ b
pH 5	$14 \pm 5$ b	$20 \pm 3$ b
pH 6	$10 \pm 1$ b	$19 \pm 3$ b

Nota: a solução controlo tem pH = 7,2; em coluna, médias seguidas por letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ );  $n=4$ .

No que diz respeito ao comprimento da raiz (Figura 10), foi possível verificar que o valor de pH dos tratamentos de germinação não influenciou significativamente o comprimento das raízes das plantas ao fim de 21 dias.



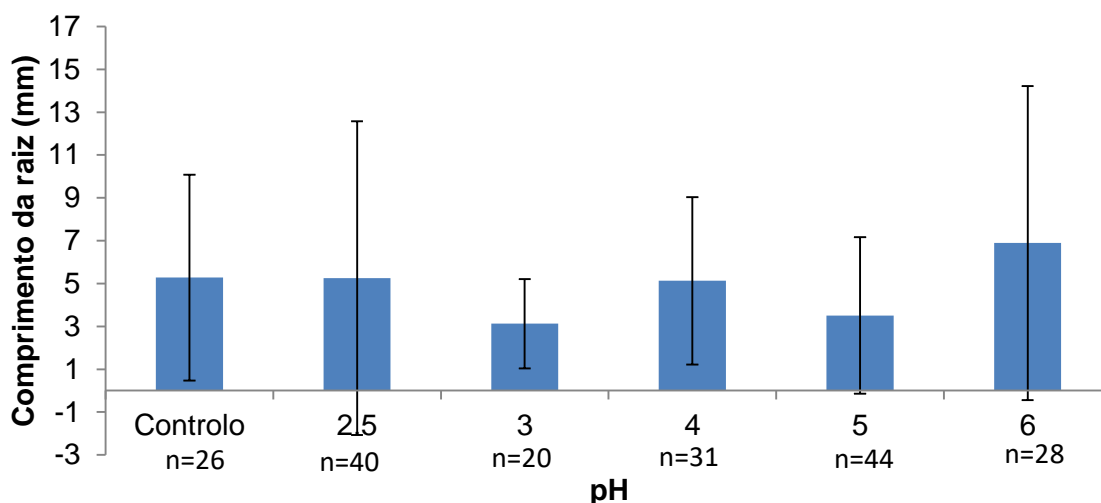


Figura 10 – Comprimento da raiz medido no último dia do ensaio (21 dias) das plantas germinadas em tratamentos com diferentes valores de pH.

Nota: não foram quantificadas diferenças significativas entre as médias do comprimento da raiz nos diferentes tratamentos; n=número de plantas efetivamente medidas.

O pH teve efeito no comprimento do caule, tendo sido observadas diferenças significativas entre as médias do comprimento do caule dos tratamentos com valores de pH mais baixos (pH 2,5 e 3) e as de pH mais elevado (pH 4, 5 e 6) (Figura 11). Porém, nenhuma diferiu do controlo (pH 7,2), o que é contraditório, impedindo tirar ilações em relação à variação do comprimento do caule com o valor de pH. Os valores máximos e mínimos estão em concordância com os comprimentos observados para a raiz.

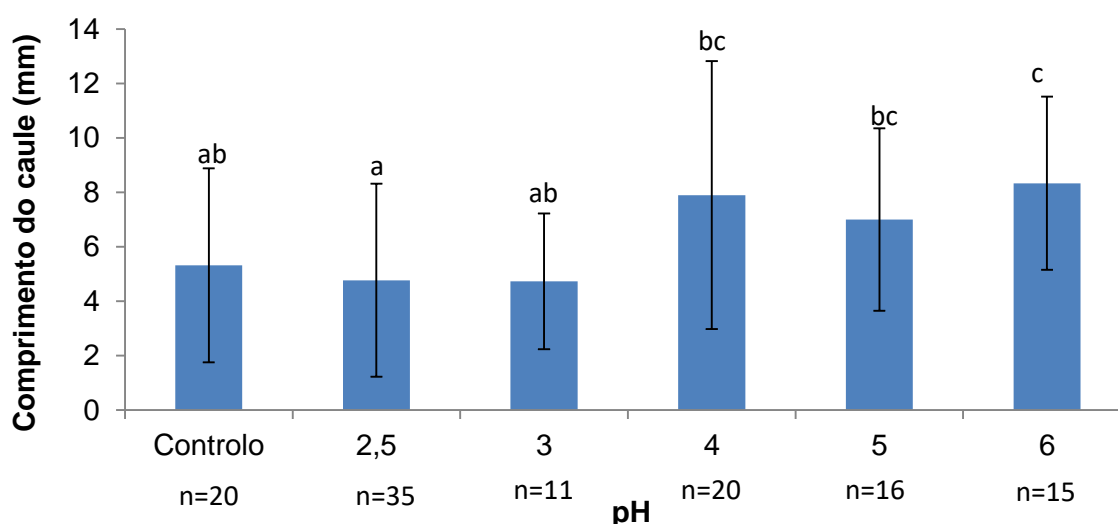


Figura 11 – Comprimento do caule medido no último dia do ensaio (21 dias) das plantas germinadas em tratamentos com diferentes valores de pH.

Nota: letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias do comprimento do caule nos diferentes tratamentos ; n=número de plantas efetivamente medidas.

O tratamento com pH 3 foi o que obteve os valores mais baixos de taxa de germinação, e de comprimentos de raiz e caule. O tratamento de pH 6, apesar de ter a terceira maior taxa de germinação, foi o que apresentou os valores mais elevados dos comprimentos de raiz e de caule.

Na Figura 12 está representado o comprimento médio da maior folha medido ao fim de 21 dias de ensaio de germinação a diferentes valores de pH, não se tendo verificado diferenças significativas neste parâmetro.

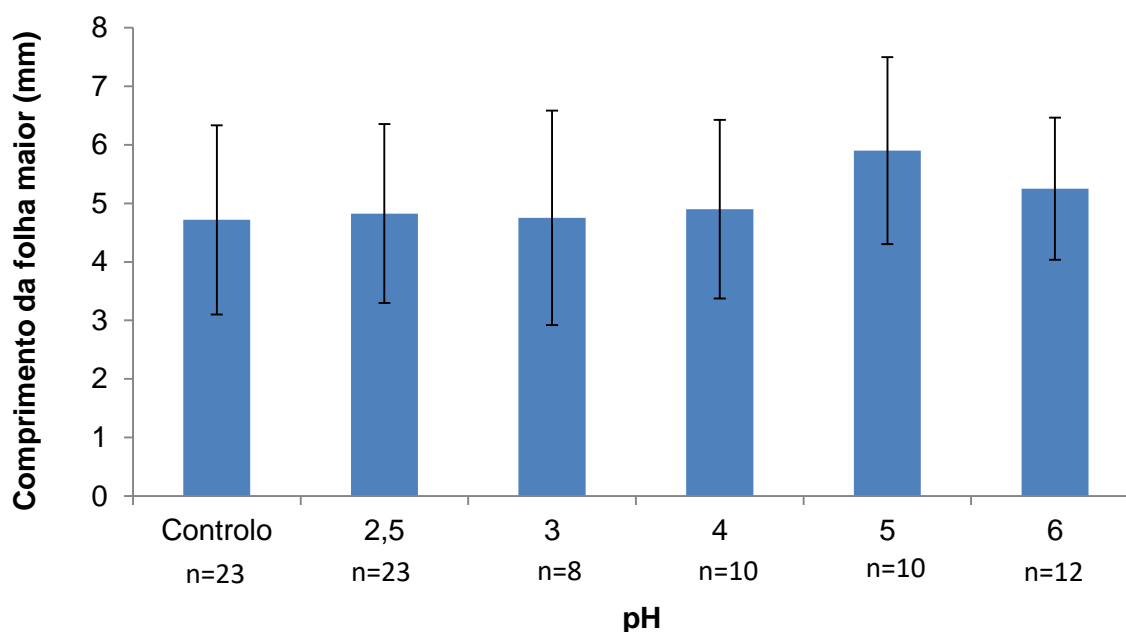


Figura 12 – Comprimento médio da maior folha medido no último dia do ensaio (21 dias) das plantas germinadas nos tratamentos com diferentes valores de pH.

Nota: não foram quantificadas diferenças significativas entre as médias do comprimento da raiz nos diferentes tratamentos. n=número de plantas efetivamente medidas.

De um modo geral, o *C. salviifolius* tem uma capacidade de germinação moderada em soluções ácidas, formando plantas viáveis, podendo facilmente germinar em solos ácidos, típicos de áreas mineiras.

#### 4.1.2. Teste de germinação de *C. salviifolius* em soluções aquosas com diferentes concentrações de As

A dinâmica da germinação ao longo do tempo em soluções aquosas com pH 4 e com diferentes concentrações de As é apresentada na Figura 13. No Anexo III pode-se observar

o resultado final do teste de germinação de *C. salviifolius* em soluções com diferentes concentrações de As ao fim de 30 dias.

A taxa de germinação mais elevada (45%) verificou-se no tratamento com 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As, a menor taxa (10%) no tratamento com 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Houve diferenças significativas entre as médias da taxa de germinação, que não se correlacionaram diretamente com o teor em As do tratamento (Anexo IV).

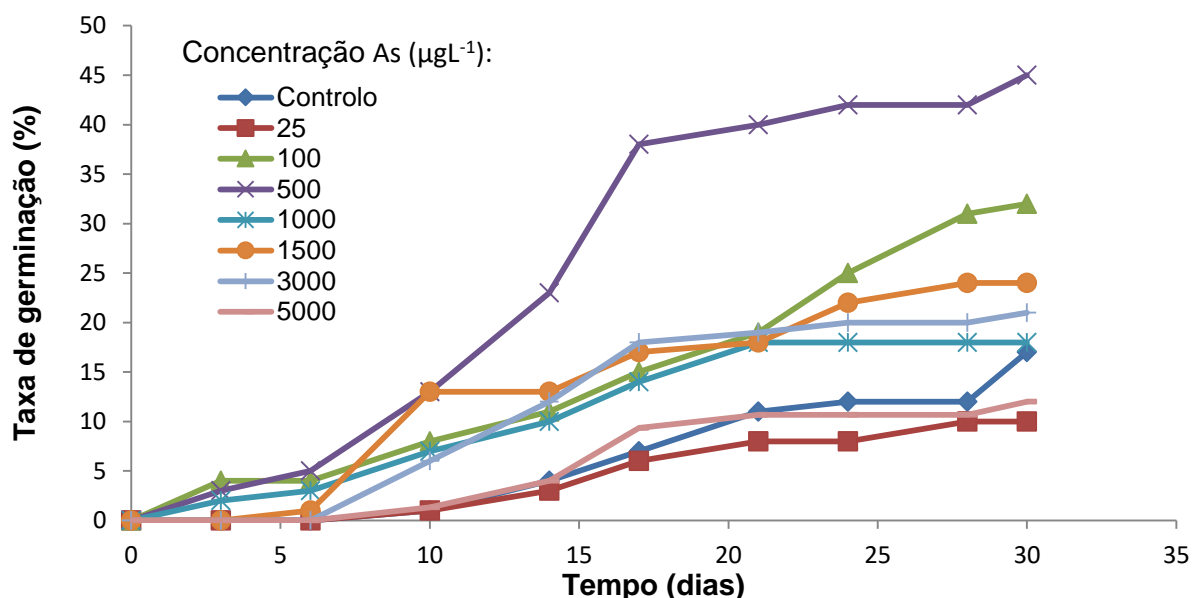


Figura 13 – Taxa de germinação acumulativa (%) das sementes de *C. salviifolius*, para o período de 30 dias, para os tratamentos com diferentes concentrações de As.

Nota: valores e diferenças significativas no Anexo IV.

O tempo (seis dias) necessário para o início da germinação das sementes ( $t_0$ ) foi mais baixo nas sementes submetidas aos tratamentos com valores de As mais baixo, o mesmo ocorreu no tempo (nove dias) necessário para alcançar 50% da taxa de germinação final ( $t_{50}$ ) (Quadro IV). Porém foi neste tratamento com 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As que a taxa de germinação foi mais baixa (Figura 13). Não foram observadas diferenças significativas em  $t_0$  e no  $t_{50}$  entre os diferentes tratamentos (Quadro IV).

Quadro IV – Valores médios e desvios-padrão do tempo decorrido até ao início da germinação das sementes de *C. salviifolius* ( $t_0$ ) e do tempo decorrido até se alcançar 50% da taxa de germinação final ( $t_{50}$ ) obtidos experimentalmente para os diferentes tratamentos de As e controlo.

Tratamento: Concentração de As ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$t_0$ (dias)	$t_{50}$ (dias)
Controlo	$13 \pm 2$	$19 \pm 4$
25	$6 \pm 7$	$9 \pm 10$
100	$7 \pm 4$	$17 \pm 6$
500	$8 \pm 4$	$13 \pm 5$
1000	$9 \pm 6$	$16 \pm 5$
1500	$10 \pm 3$	$12 \pm 4$
3000	$10 \pm 0$	$14 \pm 3$
5000	$15 \pm 6$	$17 \pm 4$

O controlo corresponde a  $0,0 \mu\text{g As L}^{-1}$ ; não se verificaram diferenças significativas em  $t_0$  e  $t_{50}$  entre os tratamentos na coluna;  $n=4$ .

O tratamento com  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de As apresentou o maior valor médio do comprimento da raiz (28,74 mm) medida no final do ensaio de germinação (Figura 14), que diferiu significativamente de todos os outros tratamentos exceto do controlo. Também foi neste tratamento que se registou o maior comprimento da parte aérea (9,45 mm) (Figura 15), mas também o menor comprimento da maior folha medida (4,02 mm) (Figura 16). Como tal, também foi o tratamento com o maior valor de massa fresca (0,0093 g) (Figura 17). O tratamento com  $3000 \mu\text{g L}^{-1}$  de As apresentou o menor valor médio do comprimento da raiz (4,52 mm), e foi o único que diferiu significativamente do controlo (Figura 14).

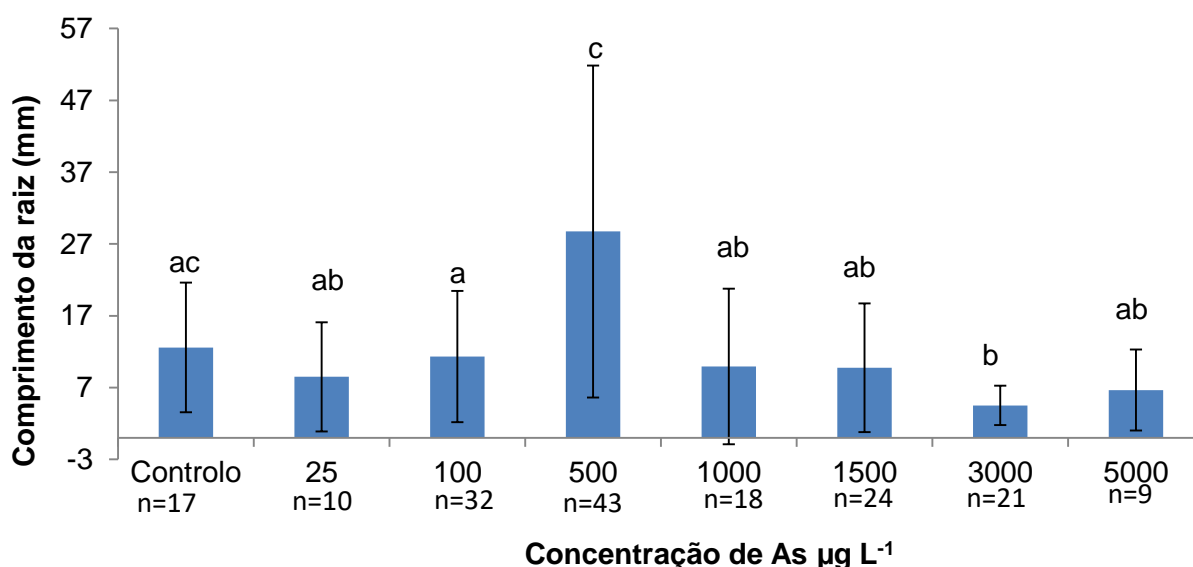


Figura 14 – Comprimento médio da raiz medido no último dia do ensaio (30 dias) das plantas germinadas em diferentes tratamentos de As.

Nota: letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias do comprimento da raiz nos diferentes tratamentos;  $n$ =número de plantas efetivamente medidas.

O comprimento médio do caule variou entre 7,18 mm (1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As) e 9,45 mm (500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As). Nenhum dos tratamentos diferiu significativamente do controlo, apesar de existirem algumas diferenças significativas entre tratamentos não diretamente correlacionadas com a concentração de As (Figura 15).

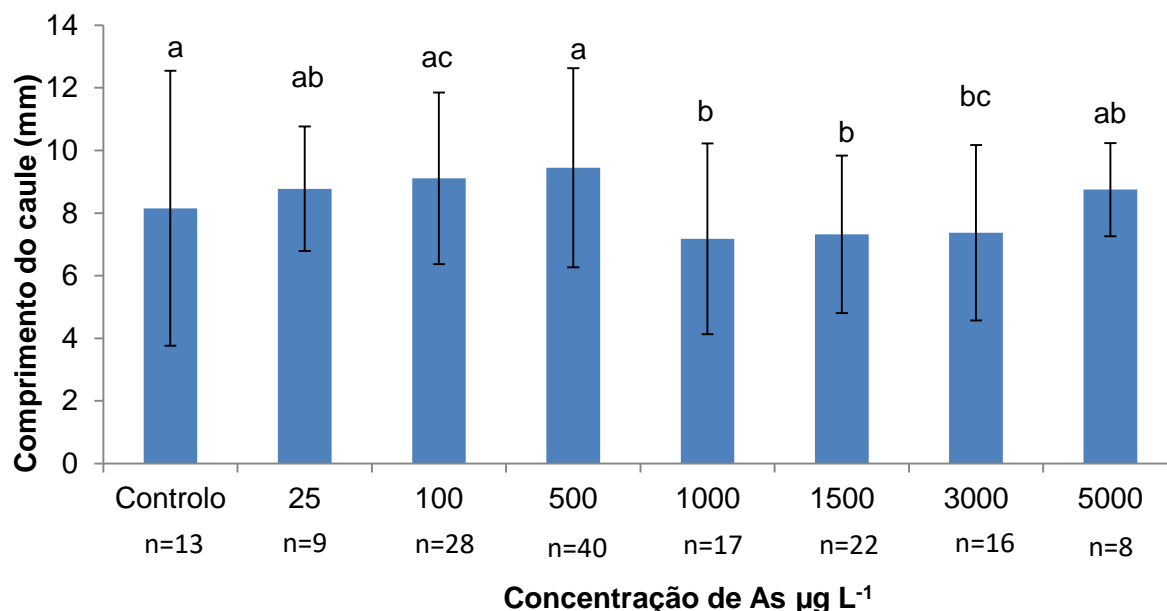


Figura 15 – Comprimento médio do caule medido no último dia do ensaio (30 dias) das plantas germinadas em tratamentos com diferentes concentrações de As.

Nota: letras minúsculas diferentes reportam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias do comprimento nos diferentes tratamentos; n=número de plantas efetivamente medidas.

Na Figura 17 está representada a variação da massa fresca obtida no final do ensaio (30 dias) de germinação em função da concentração de As. Apesar de haver diferenças significativas nas médias do comprimento da raiz, do comprimento do caule e do comprimento da maior folha da planta entre os diferentes tratamentos com As e o controlo, não foram observadas diferenças significativas no crescimento global das plantas (massa fresca) submetidas aos diferentes tratamentos.

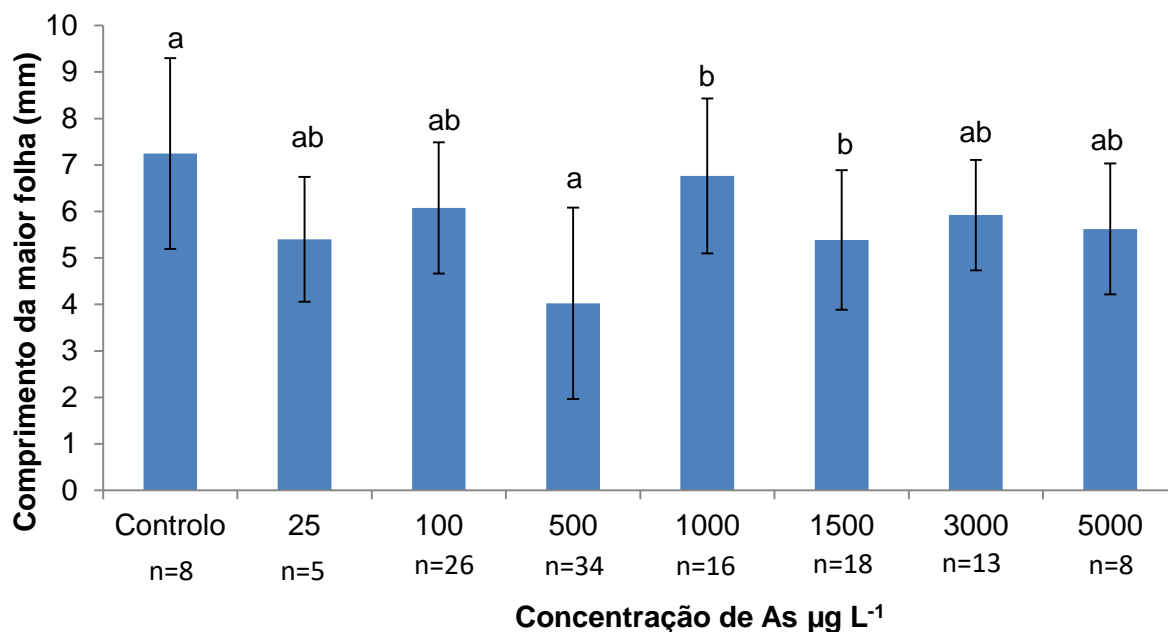


Figura 16 – Comprimento médio da maior folha medido no último dia do ensaio (30 dias) das plantas germinadas em tratamentos com diferentes concentrações de As.

Nota: letras minúsculas diferentes reportam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias do comprimento nos diferentes tratamentos, n=número de plantas efetivamente medidas.

A partir dos valores de massa fresca e massa seca foi determinado o teor de água nas plantas (Figura 18), que oscilou entre 80 e 90%, sem apresentar diferenças significativas com a concentração de As.

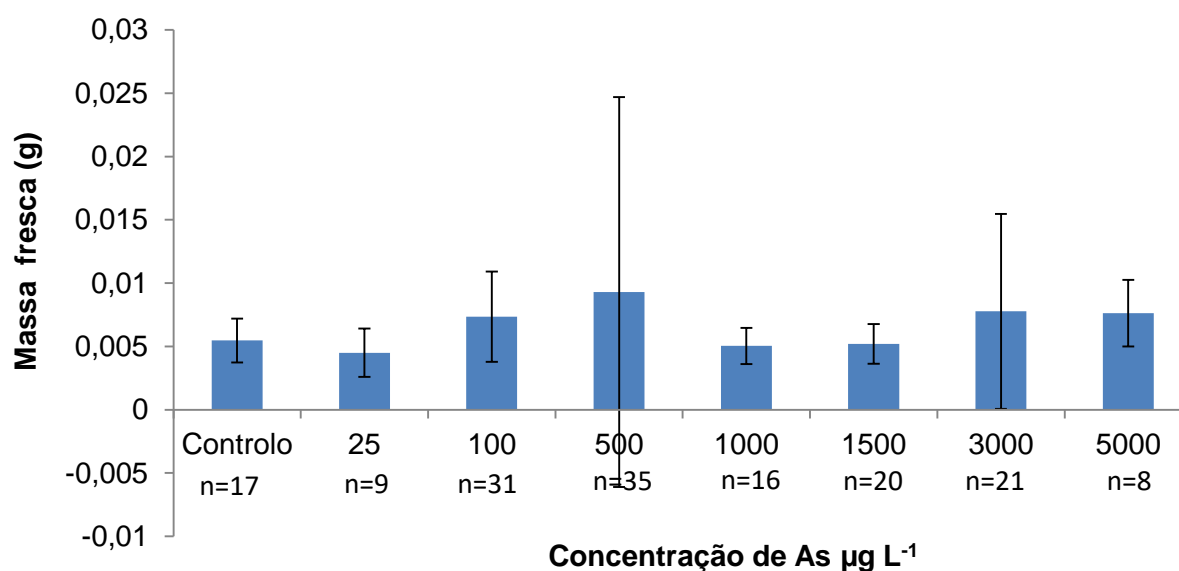


Figura 17 – Massa fresca média das plantas germinadas obtida no último dia do tratamento (30 dias).

Nota: não foram quantificadas diferenças significativas entre as médias da massa fresca nos diferentes tratamentos; n=número de plantas efetivamente medidas.

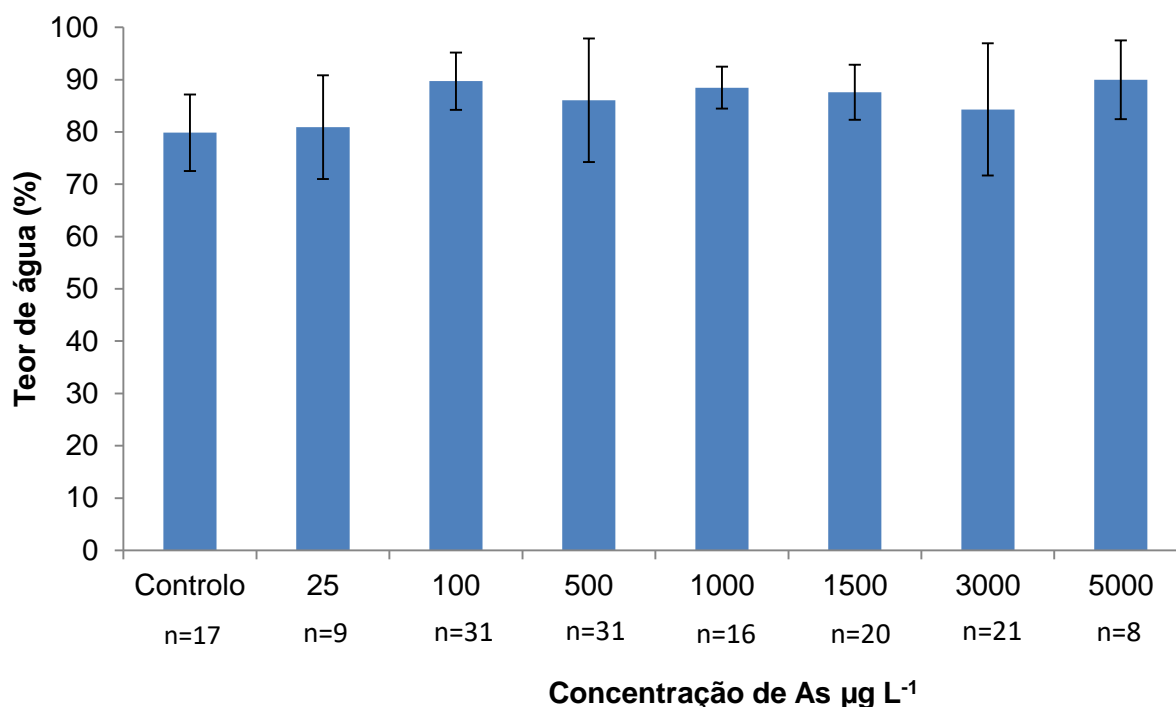


Figura 18 – Teor de água das plantas de germinadas, obtido no último dia do tratamento (30 dias).

Nota: não foram quantificadas diferenças significativas entre as médias do teor de água nos diferentes tratamentos; n=número de plantas efetivamente medidas.

## 4.2. Efeito de diferentes concentrações de As nos tratamentos em hidroponia

Inicialmente, foi realizado um ensaio em hidroponia (Ensaio I) aplicando quatro tratamentos com as concentrações de 0,0 (controlo I), 500, 1500 e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As. Contudo, como as plantas não apresentaram sinais visíveis de toxicidade e com o intuito de estabelecer um limite tóxico da concentração de As na planta, posteriormente foi realizado um segundo ensaio (Ensaio II) aplicando concentrações mais elevadas de As, de 20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , e um novo controlo II (0,0  $\mu\text{g As L}^{-1}$ ). Como tal, sempre que se verificaram diferenças significativas entre os controlos de ambos os ensaios, a análise estatística foi realizada em comparação com o respetivo controlo. Tal aconteceu nos resultados apresentados no Quadro V (elementos K, P e Zn na parte aérea) e na Figura 25 (massa seca), onde estão indicados os valores de Controlo I e Controlo II.

No Anexo V estão apresentadas fotografias dos tratamentos com diferentes concentrações de As e do controlo ao longo do tempo, nos ensaios de hidroponia. No Anexo

VI estão apresentadas fotografias tiradas no último dia do ensaio às cinco plantas medidas por tratamento.

Em todos os tratamentos de hidroponia com As e nos controlos dos dois ensaios (ensaio I: 500, 1500 e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; ensaio II: 20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), ao fim de 10 dias, algumas plantas apresentavam o primeiro par de folhas junto à raiz com necrose foliar, o que pode ser uma reação ao cultivo em hidroponia.

#### **4.2.1. Análise da composição química das plantas**

A composição química das plantas de *C. salviifolius* permitiu avaliar a possível influência da aplicação de As nas concentrações dos restantes elementos químicos naturalmente presentes nos tecidos das plantas. Os elementos quantificados foram As, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn, após 30 dias de exposição aos tratamentos com diferentes concentrações de As. As concentrações dos elementos acima mencionados estão apresentadas no Quadro V e os coeficientes de correlação de Spearman entre o As e os outros elementos químicos no Anexo XIV.

Para interpretar valores de concentrações de elementos químicos e compará-las com valores de referência é importante ter em conta que a absorção, distribuição interna e concentração de elementos nos tecidos vegetais pode variar com a espécie (Kabata-Pendias, 2011).

Os elementos As, Cu, Ca, Fe, P e Zn apresentaram maiores quantidades na raiz do que na parte aérea, enquanto que os elementos Mg, Mn e K apresentaram valores dentro da mesma gama.

A presença de As no controlo (não contaminado) deve-se unicamente ao facto de que, por se encontrar abaixo do limite de deteção do aparelho utilizado, tal como era esperado, admitiu-se que, para efeitos de tratamento estatístico o seu valor seria metade do valor calculado. O mesmo aconteceu em algumas quantificações de As no tratamento de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As na parte aérea, por isso apresentam concentrações semelhantes nesta parte da planta, contudo diferiram significativamente na raiz. Em todos os outros tratamentos a concentração de As na planta foi significativamente diferente do controlo.

A concentração de As aumentou na raiz e na parte aérea com o aumento da concentração de As na solução de hidroponia. As plantas dos dois tratamentos com concentrações mais elevadas de As apresentaram na raiz e parte aérea concentrações deste elemento semelhantes entre si mas significativamente diferente dos restantes tratamentos.



Quadro V – Concentração de elementos químicos As, Ca, Mg, Mn, Cu, Fe, K, P e Zn (média  $\pm$  desvios-padrão) nas raízes e na parte aérea das plantas, submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias.

	Tratamento	Concentração de elementos químicos (g kg <sup>-1</sup> massa seca)								
	( $\mu\text{g L}^{-1}$ de As)	As	Ca	Mg	Mn	Cu	Fe	K	P	Zn
Raiz	Controlo	0,04 $\pm$ 0,04 a	34,97 $\pm$ 35,70 a	2,36 $\pm$ 1,00	0,19 $\pm$ 0,10	0,04 $\pm$ 0,04	18,52 $\pm$ 7,12 ac	30,71 $\pm$ 8,50 a	11,05 $\pm$ 3,41	0,10 $\pm$ 0,05
	500	0,07 $\pm$ 0,02 b	41,26 $\pm$ 34,65 a	3,62 $\pm$ 1,11	0,25 $\pm$ 0,15	0,04 $\pm$ 0,03	18,71 $\pm$ 10,93 ac	34,64 $\pm$ 16,48 a	16,43 $\pm$ 5,10	0,11 $\pm$ 0,07
	1500	0,08 $\pm$ 0,01 b	18,96 $\pm$ 21,57 ab	2,60 $\pm$ 0,94	0,25 $\pm$ 0,17	0,01 $\pm$ 0,01	26,21 $\pm$ 10,78 ab	28,22 $\pm$ 5,62 a	13,40 $\pm$ 1,95	0,07 $\pm$ 0,01
	5000	0,45 $\pm$ 0,29 c	21,66 $\pm$ 15,49 a	4,63 $\pm$ 4,76	0,33 $\pm$ 0,20	0,02 $\pm$ 0,03	60,61 $\pm$ 51,96 b	55,29 $\pm$ 41,57 a	21,35 $\pm$ 11,00	0,12 $\pm$ 0,08
	20000	1,78 $\pm$ 0,72 d	125,20 $\pm$ 126,01 b	2,80 $\pm$ 1,42	0,16 $\pm$ 0,07	0,09 $\pm$ 0,09	17,94 $\pm$ 3,83 ac	11,00 $\pm$ 8,31 b	11,11 $\pm$ 4,52	0,17 $\pm$ 0,15
	30000	2,06 $\pm$ 0,03 d	178,25 $\pm$ 89,49 b	3,32 $\pm$ 1,32	0,25 $\pm$ 0,18	0,15 $\pm$ 0,07	7,77 $\pm$ 2,55 c	13,24 $\pm$ 6,10 b	10,71 $\pm$ 1,45	0,21 $\pm$ 0,02
Parte aérea	Controlo	0,004 $\pm$ 0,005 A	11,58 $\pm$ 2,73 A	3,73 $\pm$ 0,92 AB	0,21 $\pm$ 0,13 AB	0,01 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,09 AB			
	500	0,005 $\pm$ 0,003 AB	11,06 $\pm$ 5,80 A	3,25 $\pm$ 0,89 AB	0,17 $\pm$ 0,08 A	0,01 $\pm$ 0,003	0,28 $\pm$ 0,15 A			
	1500	0,0072 $\pm$ 0,007 BC	9,74 $\pm$ 1,17 A	2,99 $\pm$ 0,46 B	0,14 $\pm$ 0,06 A	0,01 $\pm$ 0,003	0,25 $\pm$ 0,14 A			
	5000	0,014 $\pm$ 0,006 C	10,75 $\pm$ 1,86 A	4,10 $\pm$ 0,64 AC	0,19 $\pm$ 0,02 AC	0,01 $\pm$ 0,0025	0,29 $\pm$ 0,12 AB			
	20000	2,20 $\pm$ 1,22 D	29,31 $\pm$ 17,75 B	6,49 $\pm$ 2,00 C	0,32 $\pm$ 0,10 BC	0,007 $\pm$ 0,01	0,74 $\pm$ 0,41 BC			
	30000	2,66 $\pm$ 1,28 D	32,85 $\pm$ 14,78 B	6,27 $\pm$ 2,17 C	0,25 $\pm$ 0,06 C	0,01 $\pm$ 0,01	0,83 $\pm$ 0,42 C			
	Controlo I							34,10 $\pm$ 4,28	2,82 $\pm$ 0,85	0,07 $\pm$ 0,02
	500							28,82 $\pm$ 6,45	3,03 $\pm$ 2,14	0,06 $\pm$ 0,03
	1500							31,07 $\pm$ 6,44	2,83 $\pm$ 0,70	0,06 $\pm$ 0,02
	5000							35,91 $\pm$ 6,87	4,73 $\pm$ 3,45	0,08 $\pm$ 0,01
	Controlo II							43,48 $\pm$ 3,81	4,61 $\pm$ 0,35	0,11 $\pm$ 0,01
	20000							61,19 $\pm$ 11,09	6,90 $\pm$ 2,95	0,13 $\pm$ 0,09
	30000							51,25 $\pm$ 7,00	9,96 $\pm$ 2,65	0,14 $\pm$ 0,06

Nota: letras minúsculas diferentes reportam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias da concentração do elemento químico da raiz nos diferentes tratamentos; letras maiúsculas diferentes reportam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias da concentração do elemento químico na parte aérea nos diferentes tratamentos; ausência de letras indica não haver diferenças significativas ( $p < 0,05$ );  $n_{\text{controlo}}$ =variável.

A concentração de As nas raízes foi maior do que na parte aérea. Este facto também foi observado por Abreu *et al.* (2012a; 2012b) que constataram que o *C. salviifolius* não translocou o As para a parte aérea, armazenando-o principalmente na raiz, o que pode sugerir um mecanismo de tolerância ao As que iniba a translocação acima de uma determinada concentração, podendo este elemento ficar retido em órgãos onde os danos metabólicos sejam menores, por possuírem maior capacidade de compartimentação vacuolar ou de formação de fitoquelatinas e metalotioninas, de forma a não prejudicar os processos metabólicos ao nível da parte aérea (Hall, 2002; Hartley-Whitaker *et al.*, 2001a). Contudo, aparentemente a partir de uma determinada concentração esse mecanismo de tolerância deixa de ser eficaz e há um aumento significativo de As na parte aérea, que induz a morte foliar seguida da morte da planta, como se observou nos tratamentos com as concentrações 20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As (Figura 27).

Com exceção do controlo, as concentrações de As na parte aérea para todos os tratamento apresentaram valores considerados excessivos ou tóxicos para várias espécies (0,005–0,02 g kg<sup>-1</sup> massa seca da folha; Kabata-Pendias, 2011).

As concentrações de As na parte aérea das plantas submetidas aos tratamentos com as duas concentrações mais elevadas foram superiores a  $0,03 \text{ g kg}^{-1}$ , o valor considerado como limite de risco de toxicidade se essas plantas forem ingeridas pelo gado (Mendez & Maier, 2008).

As concentrações mais baixas de As nas soluções de hidroponia não influenciaram a absorção do Ca pela planta (Figura 20). Porém nas duas concentrações mais elevadas houve um aumento significativo da concentração de Ca, especialmente na raiz, em relação ao controlo e restantes tratamentos, apresentando valores superiores à concentração média de Ca para as plantas superiores que é de  $1\text{--}50 \text{ g kg}^{-1}$  massa seca (Kirkby & Pilbeam, 1984). O Ca é um macronutriente essencial para as plantas, importante na formação e estabilidade das paredes celulares, na divisão celular e na manutenção da estrutura e permeabilidade da membrana, é um ativador de determinadas enzimas e regulador das respostas das células aos estímulos (Sousa *et al.*, 1998). Tem sido observado que em condições de stresse oxidativo a quantidade de Ca, sob a forma livre de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, aumenta nas plantas com o aumento de ROS, pois o Ca é responsável por um sistema de sinalização de stresse que se propaga através da planta, desencadeando respostas moleculares sistémicas nos órgãos alvo e contribuindo para a tolerância da planta ao stresse (Choi *et al.*, 2014; Mittler & Blumwald, 2015; Steinhorst & Kudla, 2013). Perante o exposto, o referido aumento significativo de Ca pode ter sido uma resposta ao stresse oxidativo gerado pelas elevadas concentrações de As na planta.

A concentração de As não influenciou o teor de Mg nas raízes das plantas, contudo, na parte aérea houve diferenças significativas entre o teor de Mg nas plantas exposta aos tratamentos com concentrações de As mais baixas ( $500$  e  $1500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de As) e no controlo, e o teor quantificado nas concentrações mais elevadas ( $20000$  e  $30000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de As), com tendência para o Mg aumentar na parte aérea com a concentração de As na solução de hidroponia. O Mg é um constituinte da clorofila e ativador de enzimas (ATPases) (Guo *et al.*, 2016), pelo que uma diminuição da sua concentração na parte aérea estaria relacionada com uma diminuição da quantidade de clorofila, contudo não foi o que se verificou, pois houve uma diminuição não significativa de clorofilas no tratamento com concentração de As mais elevada (Figura 29).

Segundo Guo *et al.* (2016) as plantas superiores para atingirem um ótimo crescimento precisam entre  $1,5\text{--}3,5 \text{ g kg}^{-1}$  de Mg e, segundo Varennes (2003), concentrações entre  $1\text{--}8 \text{ g Mg kg}^{-1}$  são consideradas adequadas na parte aérea das plantas. Num estudo realizado por Agostinho (2013) obtiveram-se  $2,177 \text{ g Mg kg}^{-1}$  de massa seca na raiz e  $1,128 \text{ g Mg kg}^{-1}$  de massa seca na parte aérea de *C. salviifolius*. Os valores obtidos para a concentração de Mg na raiz e parte aérea de *C. salviifolius* submetido aos diferentes tratamentos com As encontram-se dentro dos limites considerados adequados.

Quanto à concentração de Mn nas plantas verificou-se que o As não influenciou a sua concentração nas raízes. Porém, na parte aérea houve diferenças significativas entre a concentração de Mn nas plantas expostas aos diferentes tratamentos com As, mas apenas o tratamento de 20000 apresentou valores significativamente maiores que o controle. Ao contrário do observado por Abreu *et al.* (2012a) em que *C. salviifolius* existente em áreas mineiras acumulou mais Mn na parte aérea, não houve diferença entre as concentrações presentes nas raízes e na parte aérea das plantas no presente estudo. A concentração de Mn na parte aérea para todos os tratamentos apresentou valores considerados suficientes ou normais para várias espécies de plantas (0,03–0,3 g kg<sup>-1</sup> de massa seca da folha; Kabata-Pendias, 2011).

Apesar de não haver diferenças significativas da concentração de K entre o controle e os diferentes tratamentos na parte aérea, a concentração de K na raiz diminuiu significativamente nos dois tratamentos com maior concentração de As. À exceção destes valores, não houve grande diferença entre as quantidades de K presentes na raiz e na parte aérea. A diminuição significativa de K na raiz nos dois tratamentos com a concentração mais elevada de As pode estar relacionada com o aumento de Ca que também se verificou nestes tratamentos, pois o K é preferencialmente absorvido pela planta e a sua diminuição permite uma maior absorção do Ca (Silva & Trevizam, 2015).

O valor médio de K nas plantas superiores é 1–50 g kg<sup>-1</sup> de massa seca (Kirkby & Pilbeam, 1984) e segundo Varennes (2003) valores entre 20–50 g kg<sup>-1</sup> são consideradas concentrações adequadas na parte aérea das plantas, pelo que as concentrações de K nas plantas dos vários ensaios se encontraram dentro dos limites de referência, não existindo carência (Quadro V). Porém, os dois tratamentos com as concentrações mais elevadas de As apresentaram valores de concentração de K superiores aos considerados adequados.

A concentração de P nas plantas expostas durante 30 dias de tratamento com diferentes concentrações de As foi maior na raiz do que na parte aérea. Em ambos os ensaios não houve diferenças significativas da concentração de P entre o controle e os diferentes tratamentos, de onde se pode concluir que a concentração de As na planta não influenciou o comportamento deste nutriente, ao contrário do esperado pois é conhecida a relação antagônica entre estes elementos na absorção por parte da planta (Kabata-Pendias, 2011).

A variação da concentração de Cu nas plantas expostas durante 30 dias aos tratamentos com diferentes concentrações de As não apresentou diferenças significativas. A concentração de Cu na parte aérea para quase todos os tratamentos apresentou valores considerados suficientes ou normais para várias espécies de plantas (0,005–0,03 g Cu kg<sup>-1</sup> de massa seca da folha; Kabata-Pendias, 2011).

Relativamente à variação da concentração de Fe nas plantas expostas durante 30 dias a diferentes concentrações de As verificou-se que as concentrações de Fe na raiz nos tratamentos com 1500 e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As foram significativamente maiores do que nos restantes tratamentos, e que os menores valores foram quantificados nos tratamentos com 20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As. O teor de Fe na parte aérea da planta também diferiu significativamente entre os tratamentos com concentrações mais baixas de As e os de concentrações mais elevadas, apresentando maior valor no tratamento de 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As. Contudo, todas as concentrações de Fe na parte aérea, incluindo no controlo, foram superiores aos valores considerados normais para as plantas (0,05–0,10 g  $\text{kg}^{-1}$  de massa seca da folha; Mengel & Kirkby, 2001), o mesmo foi observado por Abreu *et al.* (2012a), que obtiveram valores de Fe na gama de 0,160–0,247 g  $\text{kg}^{-1}$  de massa seca de *C. salviifolius* que cresciam em áreas quer contaminadas quer não contaminadas, sem que tivessem sido observados sintomas de toxicidade pelo Fe. Resultados semelhantes (0,33 g Fe  $\text{kg}^{-1}$  de massa seca) foram obtidos por De la Fuente *et al.* (2010) para a mesma espécie crescendo em solos de áreas mineiras.

Curiosamente existe uma correlação negativa significativa entre a concentração de Fe na raiz e as concentrações de Ca na raiz ( $r = -0,89$ ), Ca na parte aérea ( $r = -0,94$ ) e Cu na raiz ( $r = -0,94$ ) (Anexo XIV). De facto, segundo Kabata-Pendias (2011), o Ca pode suprimir a disponibilidade de Fe e o Cu pode reduzir a quantidade de Fe nos cloroplastos da planta.

Em ambos os ensaios não houve diferenças significativas relativas à concentração de Zn entre o controlo e os diferentes tratamentos. No entanto, a concentração de Zn na raiz aumentou ligeiramente em função do valor de As nos tratamentos com maior concentração deste metaloide quando comparados com o respetivo controlo. Pela análise dos coeficientes de correlação apresentados no Anexo XIV a concentração de Zn na raiz foi a única que se correlacionou significante e positivamente com a concentração de As ( $r = 0,83$ ). Existe também uma correlação significativa positiva entre a concentração de Zn na raiz e a concentração de Ca na raiz ( $r = 0,83$ ) e a de Mg na parte aérea ( $r = 0,89$ ). Contudo, os resultados obtidos estão em desacordo com Kabata-Pendias (2011) que refere haver uma relação antagónica entre o Zn e os elementos Ca, Mg e As.

As concentrações de Zn na parte aérea para todos os tratamentos e controlo apresentaram valores considerados suficientes ou normais para várias espécies de plantas (0,027–0,150 g Zn  $\text{kg}^{-1}$  de massa seca da folha; Kabata-Pendias, 2011).

#### 4.2.2. Análise de crescimento

Os parâmetros de crescimento avaliados nas plantas submetidas aos tratamentos com 500, 1500, 5000, 20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As foram: comprimento total, das raízes e da parte aérea; peso fresco total da raiz e parte aérea (no final do ensaio), massa seca (início e final do ensaio) e o número de folhas. Foram determinados a AF o RAF. No Anexo XV podem ser consultadas as correlações obtidas entre a concentração de As na planta e os vários parâmetros de crescimento, tendo sido apenas obtidas correlações significativas com a massa fresca.

##### 4.2.2.1. Taxa de mortalidade

Nos tratamentos com 20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As verificou-se a morte de várias plantas ao longo do tratamento (Figura 19). Algumas foram removidas de forma aleatória e outras permaneceram até ao final do ensaio em hidroponia.

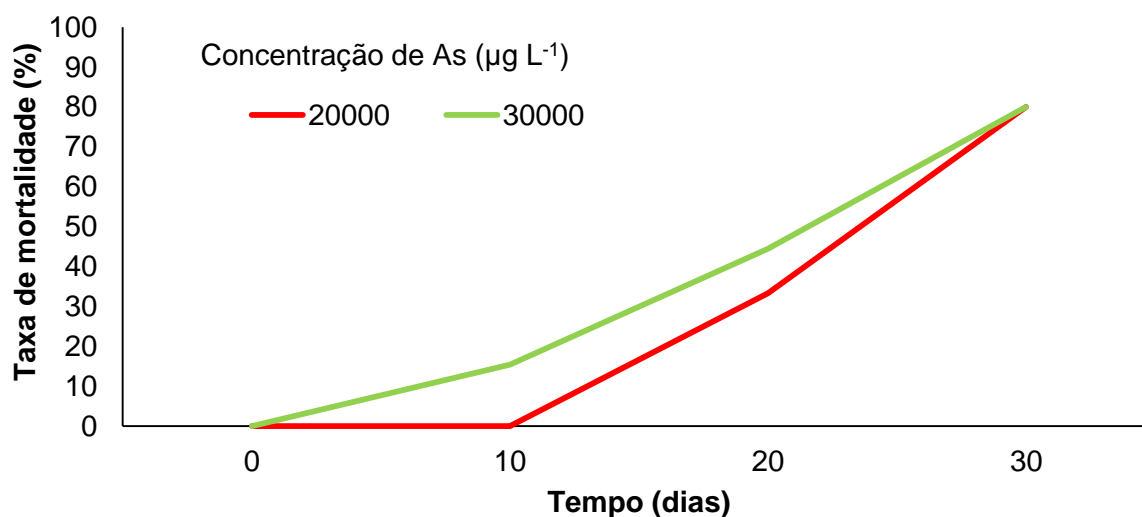


Figura 19 – Taxa de mortalidade das plantas ao longo do ensaio registadas nos tratamentos com as concentrações de 20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As.

No tratamento com 20000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As ao fim de 20 dias 33% das plantas tinham morrido e no final do ensaio esse valor subiu para 80%. No tratamento com 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As, ao fim de 10 dias 15% das plantas estavam mortas, ao fim de 20 dias 44% e ao fim de

30 dias 80%. No final do ensaio, em ambos os tratamentos apenas uma planta estava viva, mas apresentava elevados sinais de toxicidade descritos por Melo *et al.* (2007) e Kabata-Pendias (2011), destacando-se a clorose internerval e a necrose foliar.

A Figura 20 retrata a progressiva necrose foliar até à morte de uma planta exposta ao tratamento de 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As.

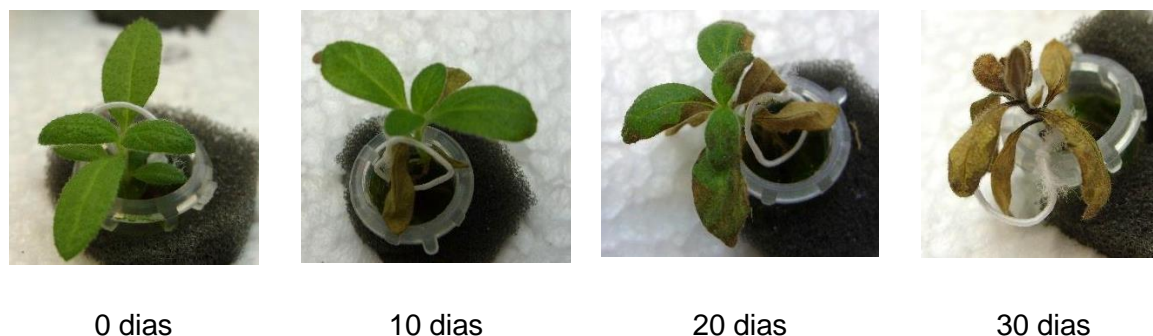


Figura 20 – Desenvolvimento de uma planta de *C. salviifolius* exposta ao tratamento com 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As, ao longo do período do ensaio (30 dias).

#### 4.2.2.2. Comprimento da planta

Na Figura 21 está representada a variação do comprimento médio das raízes de *C. salviifolius* ao longo do período de tratamento com diferentes concentrações de As. No Anexo VII apresentam-se os valores médios e as diferenças significativas entre os vários tratamentos ao longo do tempo.

O comprimento da raiz tende a aumentar ao longo do tempo, exceto nas plantas do tratamento com 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As, onde houve um pequeno decréscimo entre o dia 10 e o dia 20. As plantas submetidas à concentração de 20000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As tiveram um pequeno crescimento ao longo do tempo. À semelhança destes dois tratamentos, as plantas dos tratamentos com 500 e 1500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As não apresentaram diferenças significativas do crescimento da raiz ao longo do tempo (Anexo VII). O aumento mais significativo observou-se na concentração com 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As, e o controlo também aumentou significativamente.

No que diz respeito às diferenças entre os tratamentos e o controlo, apenas começaram a surgir diferenças significativas entre os comprimentos da raiz ao fim de 20 dias, e que se tornaram mais evidentes no final do ensaio. No dia 30, destaca-se o maior comprimento no tratamento de 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As (203,2 mm), que difere significativamente dos outros tratamentos à exceção do de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As. Os tratamentos de 20000 e 30000

$\mu\text{g L}^{-1}$  de As, semelhantes entre si mas significativamente diferentes dos restantes, apresentaram os valores mais baixos.

Perante o exposto, conclui-se que o As influenciou o crescimento da raiz a partir da concentração de  $5000 \mu\text{g L}^{-1}$  de As, tendo favorecido esse crescimento a essa concentração, e tendo um efeito negativo nos tratamentos com concentrações mais elevadas. De facto, a diminuição do tamanho da raiz é um dos sintomas de toxicidade do As nas plantas (Sneller *et al.*, 1999).

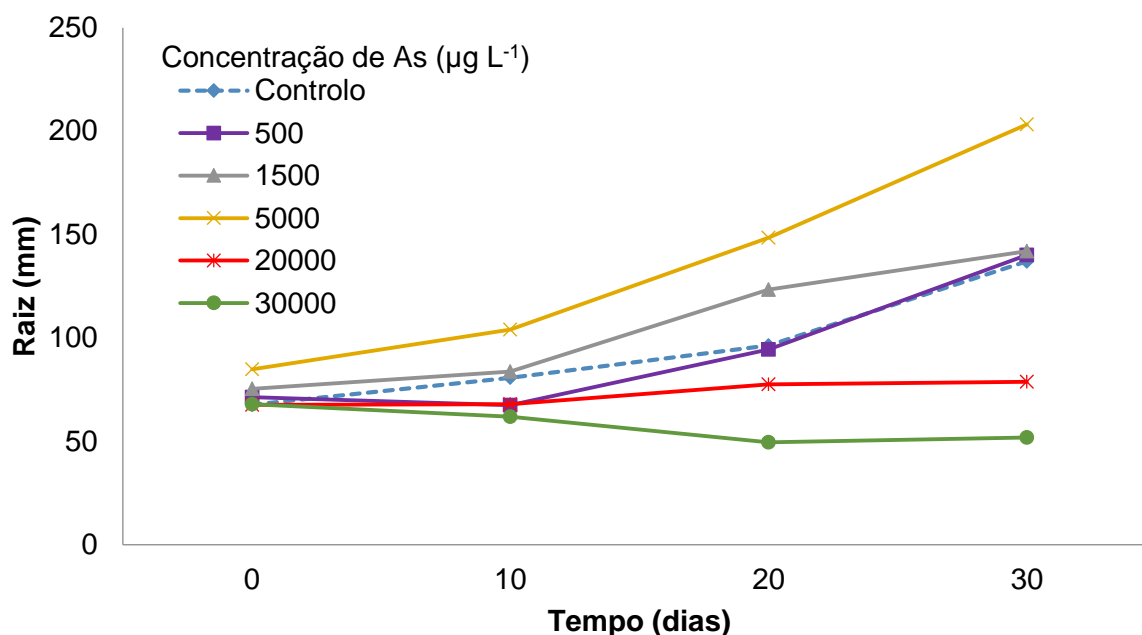


Figura 21 – Variação do comprimento médio da raiz das plantas ao longo do período de tratamento com As.

Nota: médias e tratamento estatístico no Anexo VII.

O comprimento da parte aérea da planta aumentou ao longo do tempo, como esperado. No controlo e nos tratamentos de 500, 1500 e  $5000 \mu\text{g L}^{-1}$  de As o aumento de crescimento foi mais expressivo a partir do dia 10 (Figura 22). Os maiores comprimentos da parte aérea são semelhantes entre si e foram registados no controlo (46,9 mm) e no tratamento de  $5000 \mu\text{g L}^{-1}$  de As (44,4 mm) (Anexo VIII).

O comprimento da parte aérea obtido no tratamento de  $30000 \mu\text{g L}^{-1}$  de As foi significativamente menor que o de todos os outros tratamentos no final do ensaio, um sinal de toxicidade sofrido pela planta.

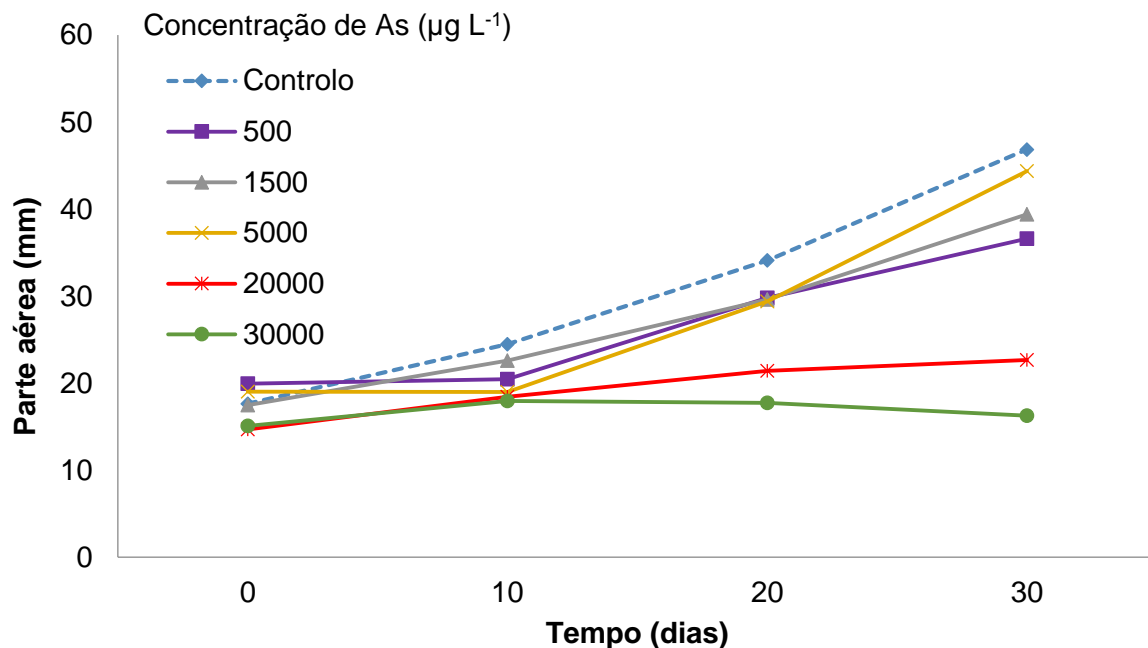


Figura 22 – Variação do comprimento médio da parte aérea das plantas ao longo do período de tratamento com diferentes concentrações de As.

Nota: médias e tratamento estatístico no Anexo VIII.

#### 4.2.2.3. Massa fresca e massa seca

Do mesmo modo que os comprimentos de raiz e parte aérea, a massa fresca total das plantas aumentou apenas nos tratamentos com concentrações de As inferiores 20000  $\mu\text{g L}^{-1}$  ao longo do tempo do ensaio em hidroponia (Figura 23). No controlo houve um decréscimo não significativo na massa fresca que se deveu ao aparecimento de uma ou duas folhas secas em todas as plantas analisadas e resultou numa diminuição da biomassa. Contudo, nestes tratamentos e no controlo, não houve uma alteração significativa da massa fresca ao longo do tempo (Anexo IX).

Nos tratamentos de 20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  ocorreu uma diminuição significativa no valor médio da massa fresca ao longo do tempo, que também se deveu ao aparecimento continuado de folhas secas na mesma planta.



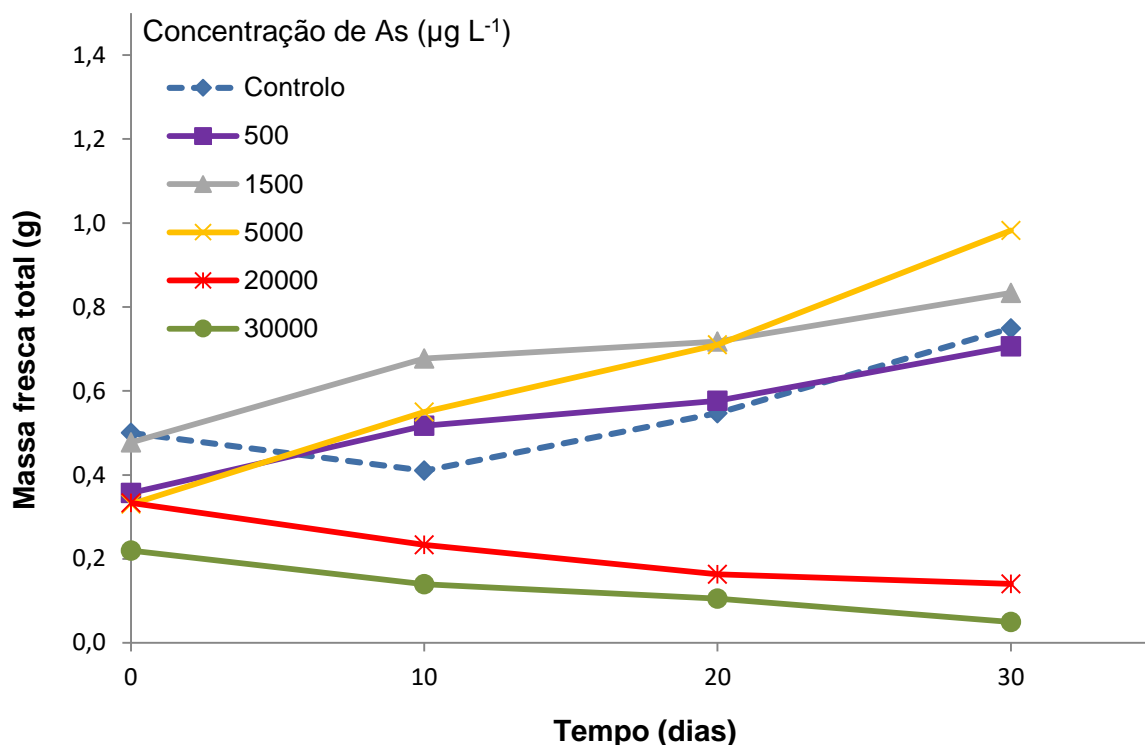


Figura 23 – Variação da massa fresca total média de *C. salviifolius*, ao longo do período de tratamento com diferentes concentrações de As.

Nota: médias e tratamento estatístico no Anexo IX.

No final do ensaio, as plantas submetidas a concentrações de As até  $5000 \mu\text{g L}^{-1}$  apresentaram massa fresca de parte aérea significativamente superior à das plantas submetidas a  $20000$  e  $30000 \mu\text{g L}^{-1}$ , tendo a massa fresca da raiz apresentado a mesma tendência de variação (Figura 24).

A correlação entre a concentração de As presente nas plantas (raiz e parte aérea) e a massa fresca total, na raiz e na parte aérea ao fim de 30 dias de tratamento foi negativa e muito alta ( $r=-0,94$  para  $p<0,01$ ; Anexo XV).

A diminuição do crescimento da planta (Carbonell-Barrachina *et al.*, 1995; Kabata-Pendias, 2011) e a diminuição do tamanho das raízes (Sneller *et al.*, 1999) são sintomas de toxicidade atribuídos ao As, e observados neste estudo.

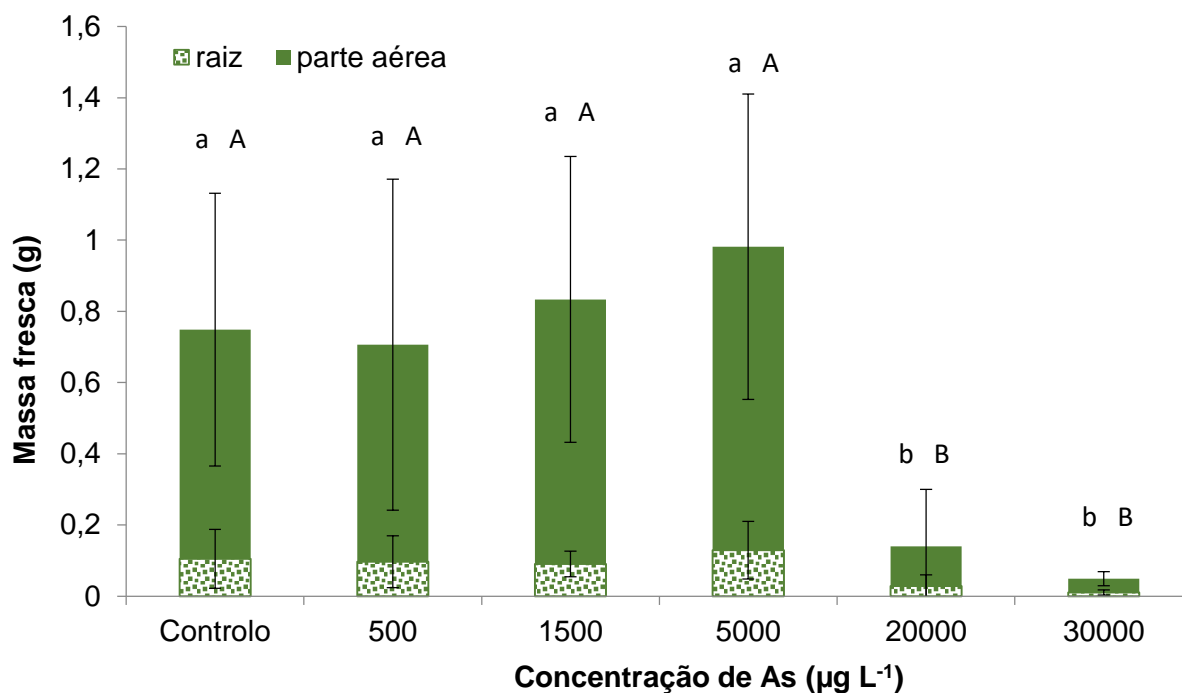


Figura 24 – Massa fresca da raiz e da parte aérea de *C. salviifolius*, no final do ensaio (30 dias), nos tratamentos com diferentes concentrações de As.

Nota: letras minúsculas diferentes reportam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias da massa fresca da raiz nos diferentes tratamentos; letras maiúsculas diferentes reportam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias da massa fresca da parte aérea nos diferentes tratamentos;  $n_{\text{controlo}}=10$ ,  $n_{\text{tratamento}}=5$ .

A Figura 25 mostra a variação da massa seca na raiz e na parte aérea em função dos tratamentos com diferentes concentrações de As nos dois ensaios de hidroponia. Como apenas foi quantificada uma planta por tratamento, a análise foi realizada comparando com o respetivo controlo. Assim, como esperado, no ensaio I (500, 1500 e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As) e II (20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As) houve um aumento de massa seca entre o controlo no início e o controlo no final. No ensaio I, a massa seca da raiz pouco variou com os tratamentos, mas a massa seca da parte aérea foi maior em relação ao controlo, alcançando o maior valor no tratamento de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Por outro lado, a massa seca da parte aérea dos tratamentos do ensaio II apresentou valores mais baixos em relação ao controlo, sendo menor no tratamento de 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

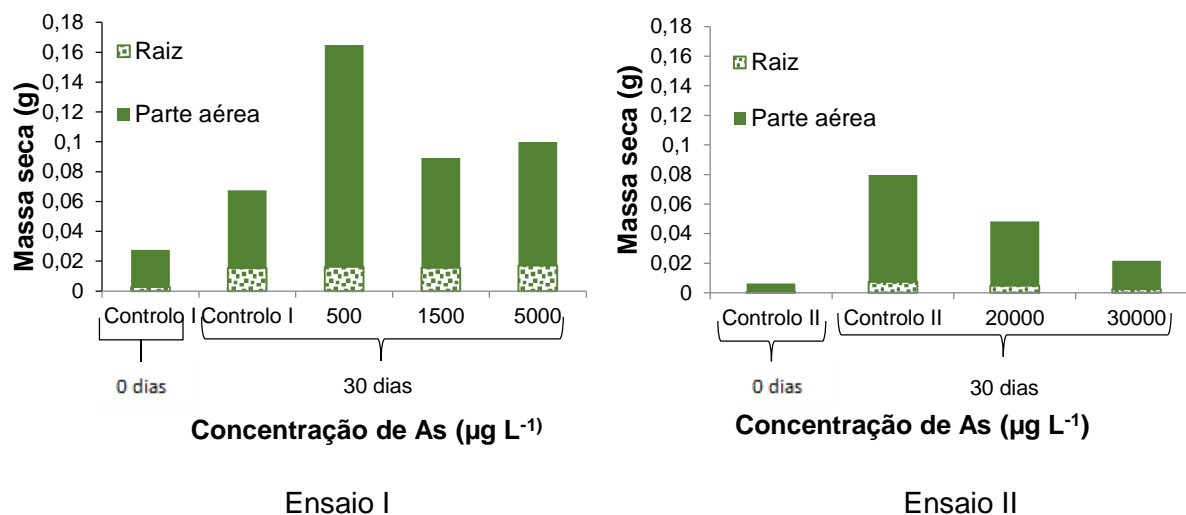


Figura 25 – Massa seca nos tratamentos com diferentes concentrações de As no final dos ensaios I e II (30 dias), e respetivo controlo no início e final dos ensaios I (500, 1500 e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As) e II (20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As).

#### 4.2.2.4. Número de folhas, área foliar e razão de área foliar

O número de folhas de uma planta vão aumentando à medida que esta se vai desenvolvendo ao longo do tempo. Este facto foi observado no controlo e nos tratamentos (Anexo X e Figura 26). No entanto, é evidente que o aumento do número de folhas nos tratamentos com concentrações mais elevadas de As (20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foi reduzido.

O maior aumento do número de folhas em todos os tratamentos ocorreu entre o dia 20 e o dia 30 (Figura 26), exceto para os dois tratamentos com concentração de As mais elevada. No controlo, em que houve diferenças significativas do número de folhas ao longo do tempo, foi onde se registou o maior aumento, seguindo-se o tratamento com 1500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As. Contudo, apenas no final do ensaio, dia 30, foi possível observar diferenças significativas do número de folhas entre o controlo e os tratamentos de 20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As.

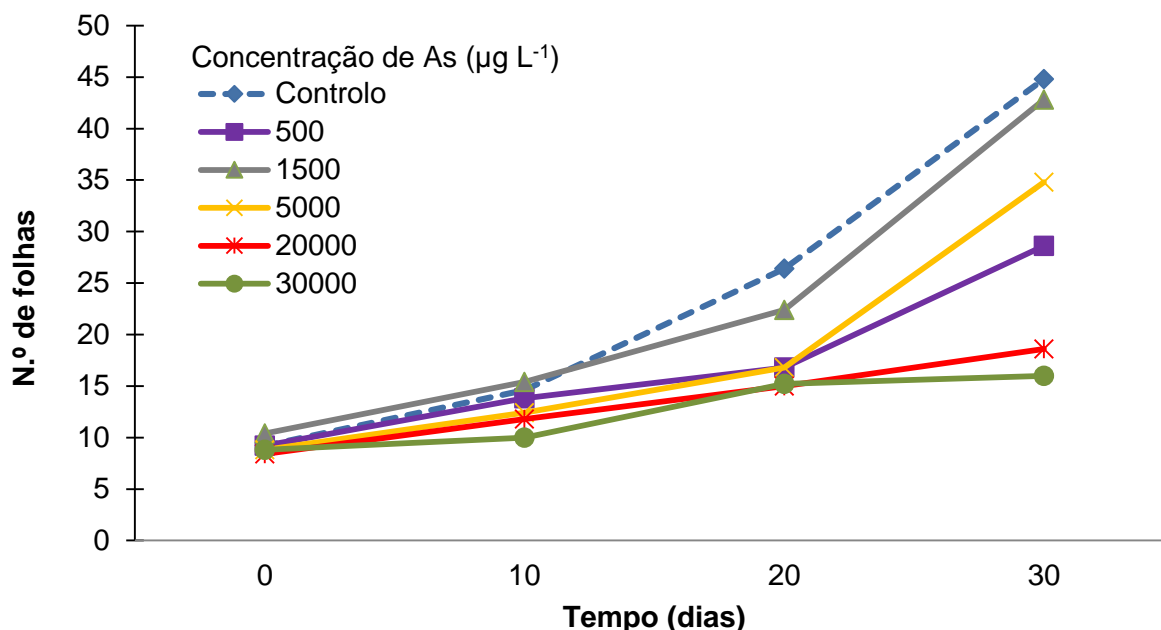


Figura 26 – Variação do número médio de folhas ao longo do período de ensaio de tratamento com diferentes concentrações de As.

Nota: valores e diferenças significativas no Anexo X.

A área foliar (AF) pode variar ao longo do ano, havendo uma distinção sazonal entre o período de verão e de inverno, em que ocorre redução da AF e consequente diminuição da superfície de transpiração, o que é uma vantagem adaptativa à xericidade estival (Correia & Ascensão, 2017). Para o *C. salviifolius* a AF pode variar entre 1,43 cm<sup>2</sup> no inverno e 0,67 cm<sup>2</sup> no verão, apresentando o valor médio de 1,06 cm<sup>2</sup> (Correia & Ascensão, 2017). Num estudo realizado por Puglielli *et al.* (2017) concluiu-se que a intensidade luminosa também influencia a AF das folhas de *C. salviifolius*, que apresentou os valores de 2,77 cm<sup>2</sup> nas folhas expostas ao sol e 6,99 cm<sup>2</sup> nas folhas à sombra.

Como o ensaio foi realizado em hidroponia a irradiância constante sem zonas de ensombramento, o défice hídrico e a intensidade luminosa não foram fatores limitativos, tendo as plantas alcançado o valor máximo de 3,1 cm<sup>2</sup> de AF ao fim de 20 dias de exposição à concentração de 5000 µg L<sup>-1</sup> de As (Anexo XI e Figura 27).

A AF aumentou ao longo do tempo até ao dia 20 no controlo e nos tratamentos de 500, 1500 e 5000 µg L<sup>-1</sup> de As. Esse crescimento foi mais expressivo nos primeiros 10 dias do ensaio, sobretudo nos tratamentos 1500 e 5000 µg L<sup>-1</sup>.

Em todos os tratamentos, exceto no controlo que manteve o mesmo valor, houve uma diminuição da AF no final do ensaio em relação ao dia 20. Este facto pode estar relacionado com a acumulação de As na planta ao longo do tempo que atingiu um limite a partir da qual se tornou tóxica com a consequente diminuição da área foliar e da capacidade

fotossintética (Marin *et al.*, 1993). Contudo, em termos estatísticos, a variação da AF no mesmo tratamento e no controlo ao longo do tempo não foi significativa (Anexo XI). Porém, a correlação da AF com a concentração de As nas plantas foi negativa ( $r = -0,60$ ) não sendo no entanto significativa (Anexo XV).

Após 20 dias de tratamento, a AF das plantas expostas às concentrações de 20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  já diferiu significativamente do controlo e dos restantes tratamentos. A semelhança entre a AF destes dois tratamentos manteve-se nos restantes dias. Em relação ao controlo, os tratamentos de 500 e 1500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As não diferiram significativamente ao longo do ensaio. Após 20 e 30 dias, os tratamentos com 5000, 20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As mostraram diferenças significativas relativamente ao controlo.

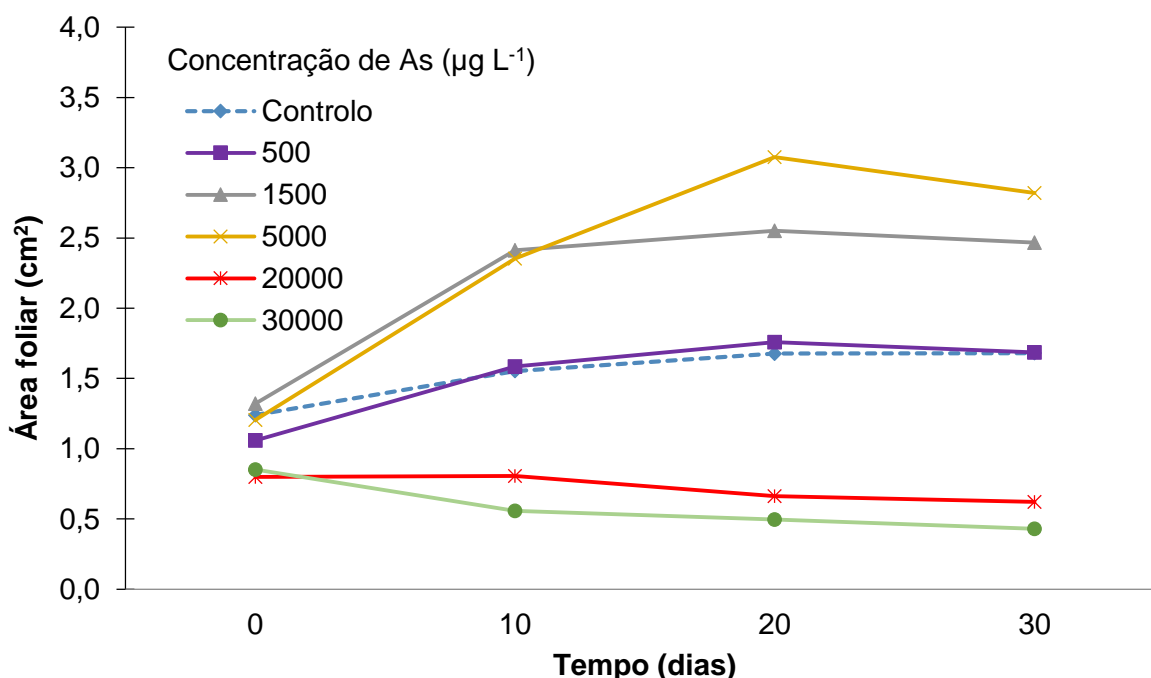


Figura 27 – Variação da área foliar (AF) ao longo do período de ensaio nos tratamentos com diferentes concentrações de As.

Nota: valores e diferenças significativas no Anexo XI.

A variação da AF por massa seca da planta é designada por razão de área foliar (RAF). Na Figura 28 pode-se observar que no Ensaio I houve uma diminuição da RAF no controlo entre o início e o final, uma vez que a planta ganhou biomassa e a AF apenas teve um ligeiro aumento em relação à massa seca. No final do ensaio, observou-se um valor de RAF maior nas plantas submetidas ao tratamento de 5000  $\mu\text{g As L}^{-1}$  quando comparado com o controlo I. No Ensaio II como as plantas utilizadas para obtenção de massa seca nas concentrações mais elevadas estavam mortas optou-se por não efetuar o cálculo de RAF.

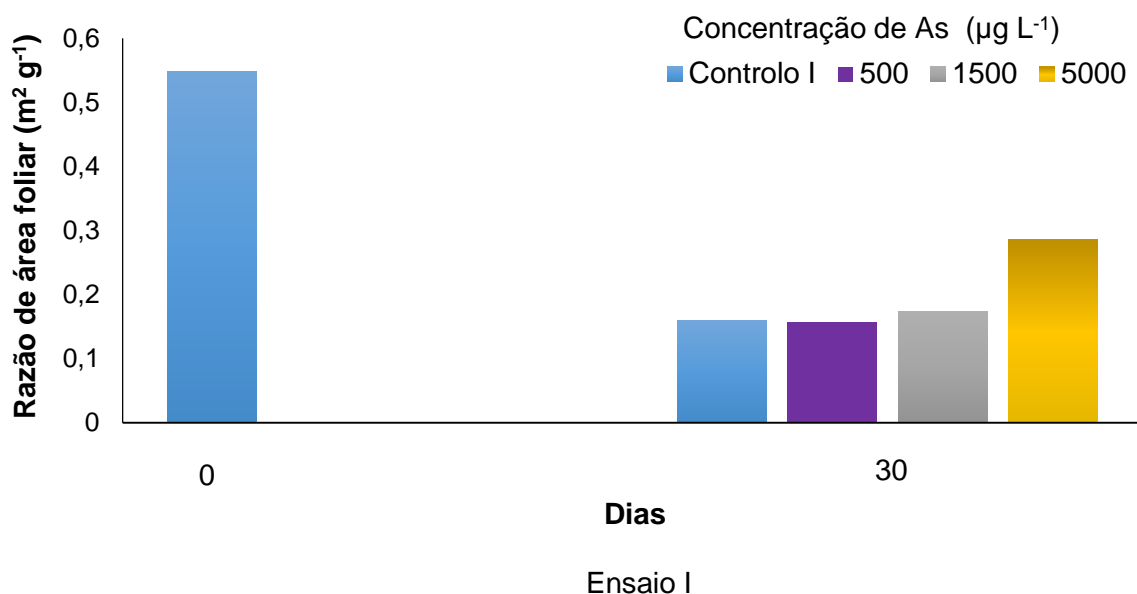


Figura 28 – Razão da área foliar (RAF) nos tratamentos com diferentes concentrações de As no final dos ensaios I (30 dias), e respetivo controlo no início e final dos ensaios I (500, 1500 e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As).

#### 4.2.3. Efeito do As no teor de clorofilas

Os pigmentos envolvidos na fotossíntese são as clorofilas *a* e *b*, os carotenóides (carotenos e xantofilas) e as ficobilinas. A clorofila *b*, os carotenóides e as ficobilinas integram os chamados pigmentos acessórios, enquanto que a clorofila *a* é o pigmento utilizado nas reações fotoquímicas.

A produção de clorofila pode variar ao longo do ano, havendo uma distinção sazonal entre o período de verão e de inverno. Assim, a concentração de clorofila total para o *C. salviifolius* pode variar entre 0,0501  $\text{mg cm}^{-2}$  de área foliar no inverno e 0,0259  $\text{mg cm}^{-2}$  no verão, possuindo o valor médio 0,0383  $\text{mg cm}^{-2}$  (Correia & Ascensão, 2017). Os valores de clorofila total obtidos no ensaio para os tratamentos com diferentes concentrações de As variaram entre 0,091  $\text{mg cm}^{-2}$  na concentração de 20000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As e 0,009  $\text{mg cm}^{-2}$  na concentração de 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo o valor do controlo inicial (dia zero) e do controlo final (dia trinta) 0,025 e 0,071  $\text{mg cm}^{-2}$  respetivamente (Figura 29).

Em todas as situações, e como seria de esperar (Lichtenthaler *et al.*, 1981), a concentração de clorofila *a* foi sempre superior à concentração de clorofila *b*. As concentrações das clorofila *a*, *b* e total no início do ensaio em hidroponia, onde a concentração de As era zero, apresentaram valores mais baixos quando comparados com o

controlo no final do ensaio (trinta dias de crescimento), existindo diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) (Figura 29). Tal pode dever-se ao facto de inicialmente as plantas serem menos desenvolvidas e por terem estado sob valores inferiores de irradiância, pois a intensidade luminosa influencia a produção de clorofilas (Puglielli *et al.*, 2017).

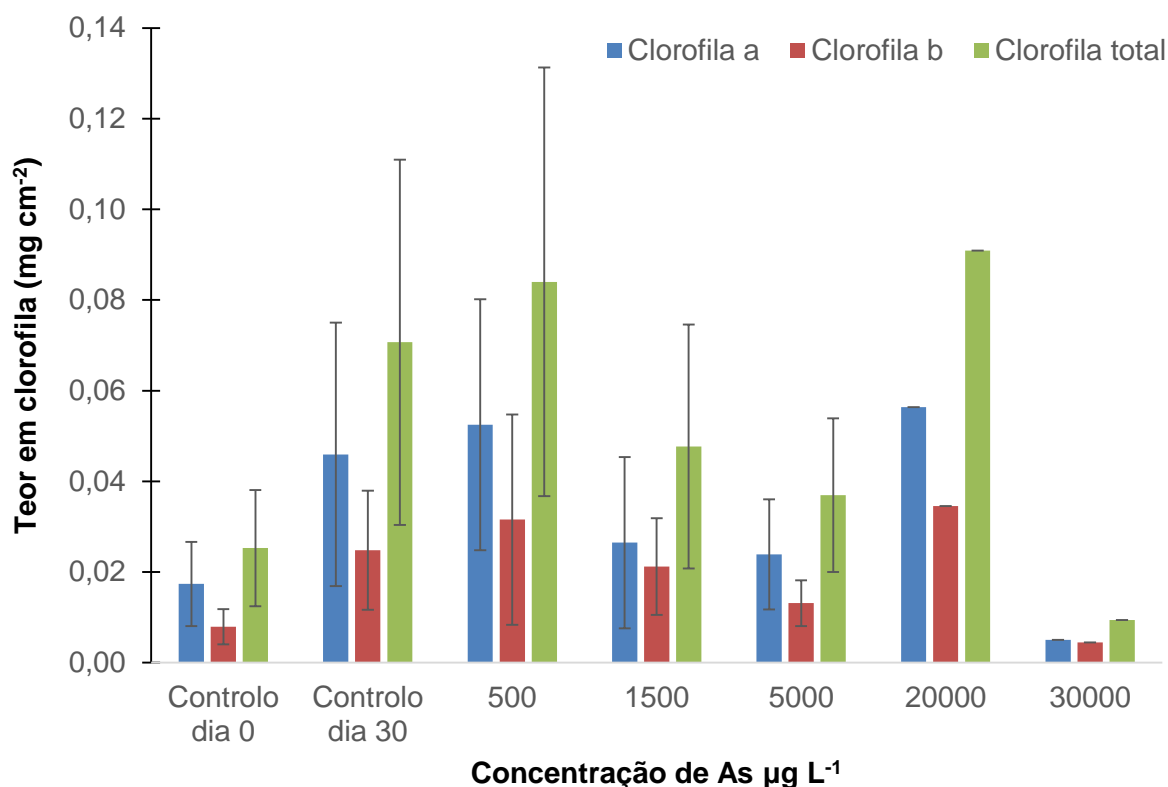


Figura 29 – Teor médio de clorofilas *a*, *b* e total, expresso em  $\text{mg cm}^{-2}$  de área foliar, para o ensaio de hidroponia de *Cistus salviifolius* submetido às concentrações de 0,0 (controlo), 500, 1500, 5000, 20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As durante trinta dias, e também para o controlo no início do ensaio (zero dias).

Nota: existem diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os teores das clorofilas no controlo dia 0 e o controlo dia 30; não há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos teores de cada tipo de clorofila nos diferentes tratamentos com As ao fim de 30 dias.

Comparando o teor médio das clorofilas nos cinco tratamentos com o controlo no final do ensaio, verificou-se que as plantas que cresceram em soluções com concentrações de 500 e 20000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As apresentaram valores ligeiramente mais elevados, e as plantas das concentrações 1500 e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As apresentaram valores ligeiramente mais baixos, sendo ainda mais baixo na concentração 30000  $\mu\text{g As L}^{-1}$ . Contudo, as diferenças no teor das clorofilas das folhas de *C. salviifolius* destes seis tratamentos (incluindo o controlo) não foram consideradas significativamente diferentes (Figura 29) nem se obteve uma

correlação significativa com a concentração de As na planta (Anexo XV), porém foi negativa e maior para a clorofila *a* ( $r = -0,77$ ).

É importante salientar que, nas concentrações mais elevadas de As (20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), apenas uma das cinco plantas sobreviveu e foi essa que serviu para determinar as clorofilas.

A razão clorofila *a/b* apresentou valores médios que variaram entre 2,3 (referente às plantas utilizadas no início do ensaio) e 1,3 (referente às plantas expostas durante trinta dias à concentração de 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Porém, não se verificaram diferenças significativas desta razão entre os diferentes tratamentos de As durante trinta dias, nem entre as plantas do controle inicial e do controle final (Figura 30).

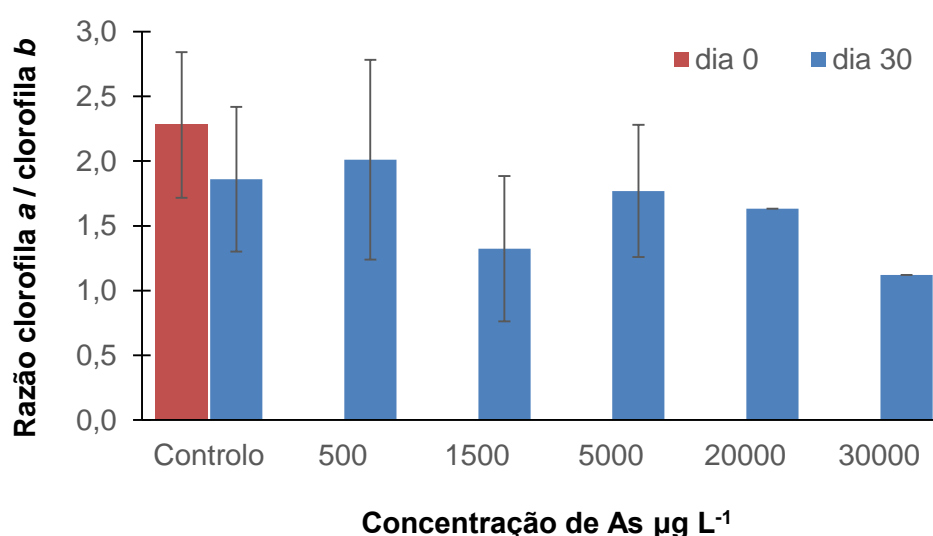


Figura 30 – Razão clorofila *a/b* obtida no ensaio de hidroponia de *C. salviifolius*, submetido às concentrações de 0,0 (controle), 500, 1500, 5000, 20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As durante trinta dias, e também para o controle no início do ensaio (zero dias).

Nota: não foram quantificadas diferenças significativas entre a razão clorofila *a/b* no controle dia 0 e o controle dia 30; e entre os diferentes tratamentos com As ao fim de 30 dias.

De acordo com Lichtenthaler *et al.* (1981), a razão clorofila *a/b* é aproximadamente de 3 para 1. As condições de crescimento, o tipo de folha e os fatores ambientais (luminosidade, nutrientes, etc.) podem afetar essa razão. Num estudo conduzido por Puglielli *et al.* (2017) em solos não contaminados os valores da razão clorofila *a/b* para o *C. salviifolius* variaram entre 3 e 4, sendo que as folhas expostas ao sol apresentaram maior valor em relação às folhas na sombra. Os valores médios obtidos para esta razão nos ensaios realizados ficaram aquém do esperado, incluindo nas plantas que não foram sujeitas à presença de As. Contudo, num estudo realizado por Nuñez-Oliveira *et al.* (1996)



em solos não contaminados da Península Ibérica obtiveram-se valores da razão clorofila *a/b* para o *Cistus ladanifer* que variaram entre 1,72 e 4,91, e em outro estudo realizado por Arenas-Lago *et al.* (2016) a razão média foi de 1,86 para o *Cistus monspeliensis* em solo não contaminado, tendo diminuído em solo contaminado com Zn, assim como as concentrações de clorofilas *a* e *b*. Estes resultados apontam para uma grande heterogeneidade de valores, pelo que é possível que os valores de razão clorofila *a/b* de *C. salviifolius* observados nesta experiência não se afastem muito do que pode ser considerado normal para a espécie, à exceção do baixo valor do tratamento de 30000 µg As L<sup>-1</sup>.

#### **4.2.4. Efeito do As na concentração de peróxido de hidrogénio**

A exposição ao As geralmente induz a produção de ROS nos tecidos das plantas originando a peroxidação lipídica que pode levar à destruição da membrana celular (Hartley-Whitaker *at al.*, 2001b). Uma dessas espécies de ROS é o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogénio). A presença de ROS em excesso tem como resposta a produção de metabolitos antioxidantes e de numerosas enzimas envolvidas na defesa antioxidante (Finnegan & Chen, 2012; Meharg & Hartley-Whitaker, 2002).

Nas plantas do controlo a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi maior na raiz do que na parte aérea (Figuras 31 e 32). A variação dessa concentração na raiz não foi significativa ao longo do tempo, apesar de revelar uma tendência para diminuir em todos os tratamentos. É de referir que não foi possível quantificar a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na raiz e na parte aérea da planta do tratamento de 30000 µg L<sup>-1</sup> de As, no final do ensaio, pois a única planta disponível estava parcialmente seca, sem material biológico suficiente para análise.

A variação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre os vários tratamentos na raiz não foi linear relativamente ao aumento da concentração de As ao longo do tempo, apesar de haver algumas diferenças significativas entre os tratamentos e o controlo ao fim de 10, 20 e 30 dias. Contudo, verifica-se um aumento significativo de concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre os tratamentos de concentrações mais baixas de As (500 e 1500 µg L<sup>-1</sup>) e os de concentrações mais elevadas (20000 e 30000 µg L<sup>-1</sup> de As) ao fim de 10 e 20 dias de ensaio.

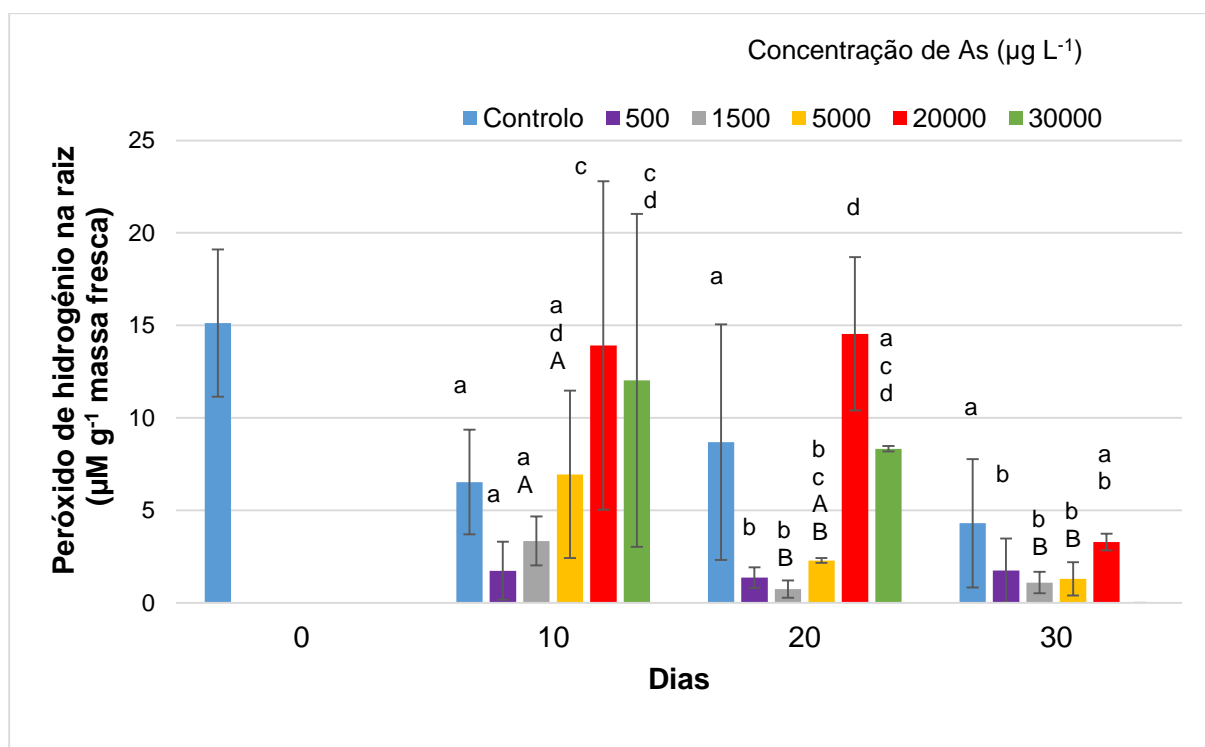


Figura 31 – Concentração média de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) quantificado na raiz das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias.

Nota: médias seguidas de letras maiúsculas diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo para uma dada concentração de As; as letras minúsculas diferentes dizem respeito à existência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias nas diversas concentrações de As para um dado dia.

A concentração de  $H_2O_2$  na parte aérea no controlo teve inicialmente um aumento significativo seguido de um decréscimo também significativo no final do ensaio, sugerindo que outro factor que não a concentração de As estivesse a provocar estas variações, como por exemplo a mudança para um sistema de hidroponia com novas condições (maior irradiância e menor fotoperíodo) tenha provocado um stresse oxidativo inicial que depois foi superado com a aclimatização das plantas, tal como aconteceu num estudo realizado por Carvalho *et al.* (2008) onde se observou o aumento de produção de ROS ( $H_2O_2$  e  $O_2^{\cdot-}$ ) em algumas plantas de *Nicotiana benthamiana* e de *Solanum lycopersicon* após a transferência de *in vitro* para *ex vitro* sob irradiância quatro vezes maior, seguida de uma diminuição que indicou a recuperação do stresse oxidativo. Por outro lado, a própria planta pode sofrer flutuações normais na concentração de  $H_2O_2$  sem estarem relacionadas com o stresse oxidativo, mas com a formação de novas estruturas nas plantas (Carvalho *et al.*, 2006). A concentração de  $H_2O_2$  na parte aérea nos tratamentos de 5000 e 30000  $\mu g L^{-1}$  também sofreu variações significativas ao longo do tempo. Apenas ao fim de 20 dias de tratamento foram observadas diferenças significativas no valor de  $H_2O_2$  entre as plantas expostas a

diferentes concentrações de As, destacando-se as concentrações mais elevadas (20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) que foram semelhantes entre si (Figura 32).

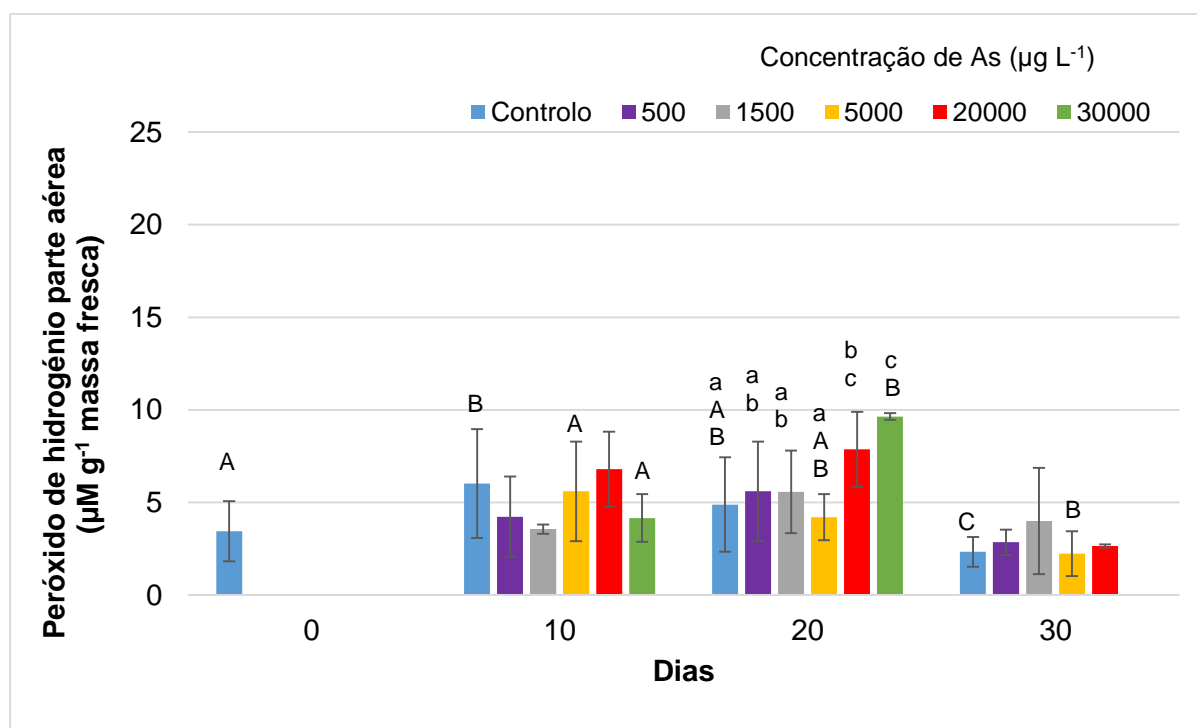


Figura 32 – Concentração média de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) quantificado na parte aérea das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias.

Nota: médias seguidas de letras maiúsculas diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo para uma dada concentração de As; as letras minúsculas diferentes dizem respeito à existência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias nas diversas concentrações de As para um dado dia.

No final do ensaio a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na parte aérea não variou significativamente entre os tratamentos com diferentes concentrações de As e o controlo, o que sugere que a planta conseguiu manter a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a um nível não tóxico, contudo a mortalidade verificada nos dois tratamentos com concentrações de As mais elevadas é incongruente com esta justificação, pelo que, o stresse oxidativo verificado pode dever-se à presença de outras ROS, como por exemplo o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{HO}^{\cdot}$  e  $^1\text{O}_2$ . Destes ROS, o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  é mais estável que os restantes e é dismutado a  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela SOD, algo que pode não ter ocorrido a uma velocidade suficiente provocando o stresse oxidativo e consequente morte das plantas (Apel & Hirt, 2004).

#### 4.2.5. Efeito do As na concentração de ascorbatos e glutatonas

Numa situação de stresse oxidativo são desencadeados mecanismos de remoção de ROS, onde o AsA e a GSH intervêm na redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a água podendo atuar em conjunto no ciclo de ascorbato-glutatonas ou individualmente (Anjum *et al.*, 2012, Apel & Hirt, 2004). A GSH para além de atuar na defesa e proteção celular tem outras funções na planta, uma das quais é reduzir o arsenato rapidamente a arsenito através de uma reação não enzimática (Meharg & Hartley-Whitaker, 2002).

Os valores médios, respetivo desvio-padrão e diferenças significativas das concentrações de ASC total, AsA e DAsA, e glutatonas total, GSH e GSSG respetivamente constam dos Anexos XII e XIII. As correlações entre as concentrações destes metabolitos antioxidantes e a concentração de As na planta apresentam-se no Anexo XVI. É de referir que não foi possível quantificar as concentrações de ascorbatos e de glutatonas na raiz e na parte aérea da planta do tratamento de 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As, no final do ensaio, pois a única planta disponível estava parcialmente seca, sem material biológico suficiente para análise que pudesse fornecer resultados fiáveis.

As concentrações de ASC total, AsA, DAsA, glutatonas total, GSH e GSSG foram sempre maiores na raiz do que na parte aérea das plantas.

Na raiz, a concentração de ASC total foi maior no tratamento com a concentração mais elevada de As (30000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ao longo do tempo, o mesmo aconteceu com a concentração de DAsA ao fim de 10 e 20 dias (não há dados deste tratamento para 30 dias) (Figura 35).

Ao longo do tempo a concentração de ASC total na raiz e na parte aérea do controlo sofreu variações (diminuição e aumento) significativas ao longo do tempo tal como o observado para a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que foram acompanhadas pelas mesmas flutuações na concentração de AsA, indicando que a produção do ascorbato na forma reduzida é o responsável pelas variações na concentração total desta substância e que estas não dependem da concentração de As na planta (Anexo XII e Figuras 33 e 34). A concentração de DAsA na parte aérea apresentou valores semelhantes e tendeu a diminuir nos diferentes tratamentos e controlo ao longo do tempo, à exceção do tratamento com a concentração mais elevada de As onde aumentou ao longo do tempo (Figura 36).

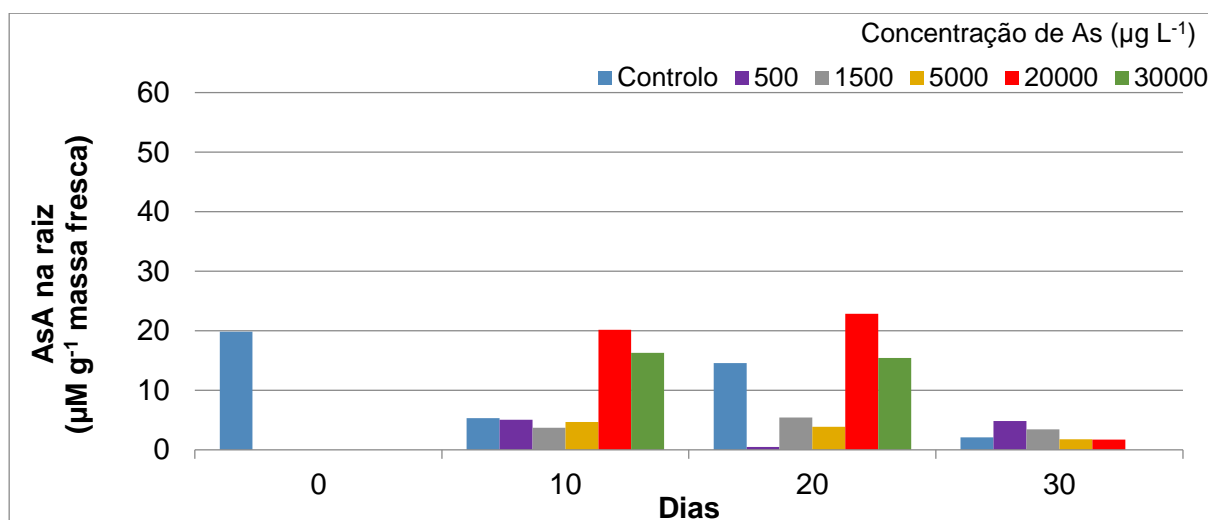


Figura 33 – Concentração média de AsA quantificado na raiz das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias.

Nota: valores e diferenças significativas no Anexo XII.

As concentrações de ASC total e AsA na raiz e na parte aérea nos tratamentos nas duas concentrações mais elevadas de As (20000 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) são superiores aos restantes tratamentos e controlo ao fim de 10 e 20 dias de ensaio. No entanto, no tratamento de 20000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As a concentração de AsA e ASC total diminui para valores semelhantes ao controlo, no final do ensaio.

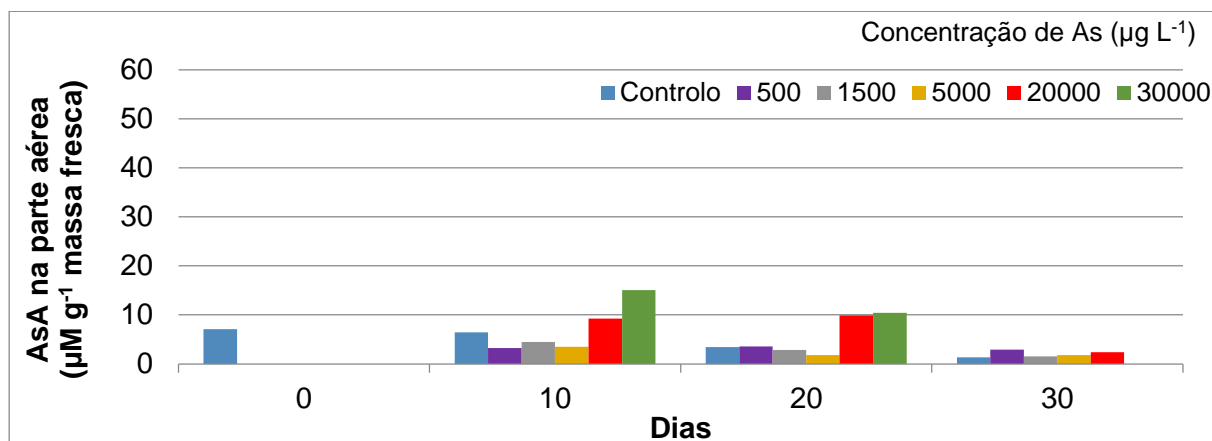


Figura 34 – Concentração média de AsA na parte aérea das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias.

Nota: valores e diferenças significativas no Anexo XII.

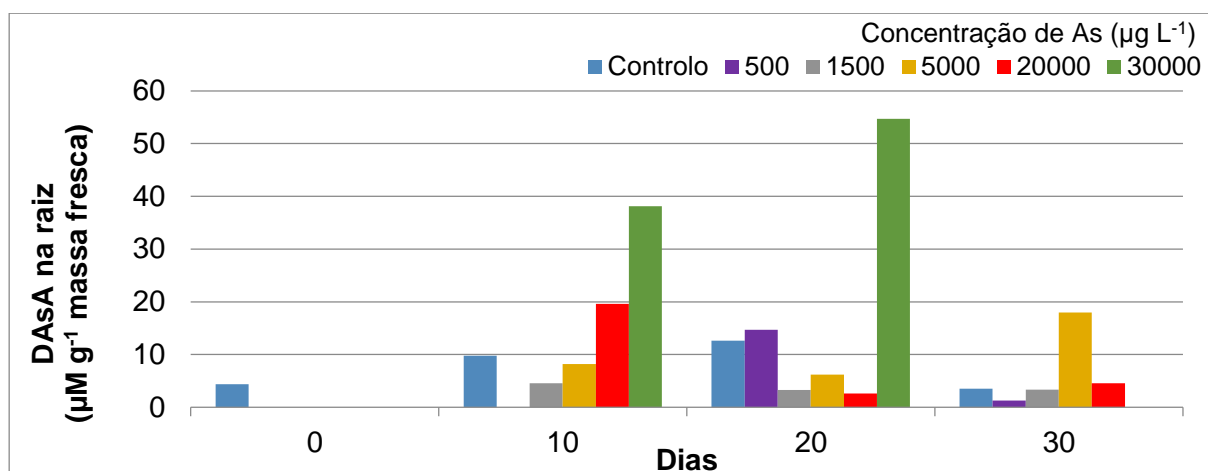


Figura 35 – Concentração média de DASa quantificado na raiz das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias.

Nota: valores e diferenças significativas no Anexo XII.

No final do ensaio não houve diferenças significativas entre os diferentes tratamentos com As e o controlo nas concentrações de ASC total, AsA e DASa (Figuras 35 e 36), com exceção de AsA na parte aérea, em que os tratamentos com as concentrações de 500 e 20000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As apresentaram valores significativamente superiores ao do controlo e semelhantes entre si (Anexo XII). Foi também para a concentração de AsA e de ASC total na parte aérea, no final do ensaio, que se verificou uma correlação positiva significativa com a concentração de As na raiz e na parte aérea ( $r = 0,83$ ; Anexo XVI). Este aumento na quantidade de AsA na parte aérea na sua forma reduzida também foi verificado num estudo realizado por Arenas-Lago *et al.* (2016) em plantas de *Cistus monspeliensis* em resposta ao stresse induzido por concentrações elevadas de Zn.

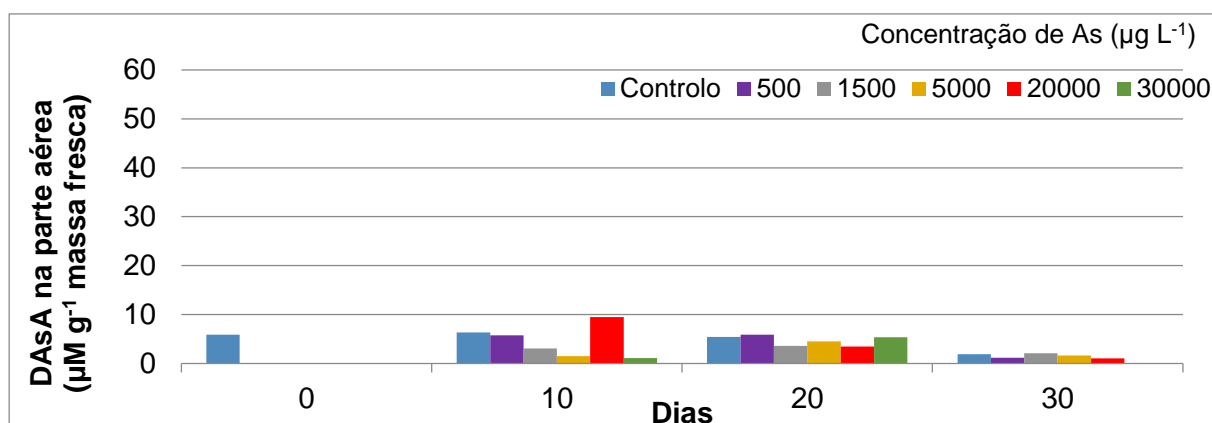


Figura 36 – Concentração média de DASa na parte aérea das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias.

Nota: valores e diferenças significativas no Anexo XII.

A percentagem de redução de ascorbato e a percentagem de redução de glutatona permite-nos analisar a quantidade existente na sua forma reduzida (AsA e GSH respetivamente) em relação ao seu total presente nas plantas (uma indicação do potencial redox nas células) e assim relacionar com a eficiência na remoção de ROS (Mittler, 2002). Níveis altos de percentagem de redução são necessários para manter um mecanismo de remoção de ROS eficiente.

Na Figura 37 observa-se que não houve diferenças significativas da variação da percentagem de redução de ASC da raiz no mesmo tratamento ao longo do tempo, exceto para o tratamento com 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As, que está em conformidade com a variação da concentração de AsA para este tratamento.

Apenas foram observadas diferenças significativas na percentagem de redução do ASC na raiz entre tratamentos ao fim de 20 dias de exposição ao As, em que o tratamento de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As apresentou o valor mais baixo e o tratamento de 20000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As um valor significativamente mais elevado. Neste último tratamento uma maior percentagem de redução do ASC na raiz sugere erroneamente maior eficiência na remoção de ROS. No entanto, verificou-se a necrose foliar e morte de algumas plantas indicando que estas já não conseguiram combater o stresse oxidativo provocado pelo As, pelo que o aumento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ter induzido a produção de AsA que se acumulou na raiz em vez de ser utilizado no ciclo do ascorbato-glutationa e por isso não removeu o  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

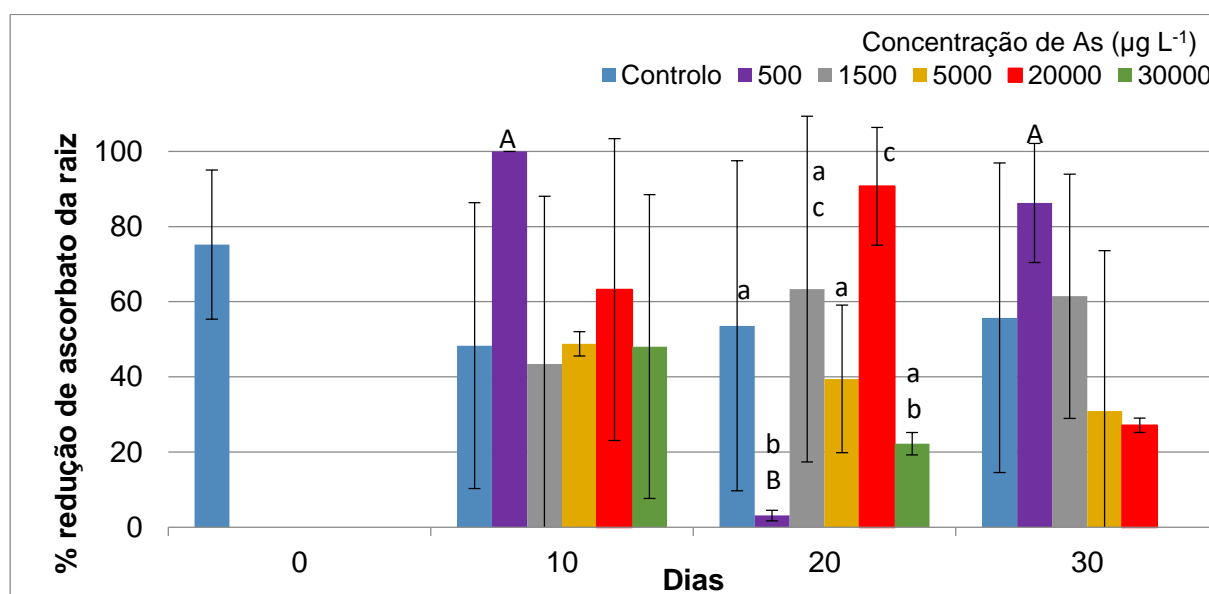


Figura 37 – Percentagem de redução de ascorbato na raiz das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante 30 dias.

Nota: médias seguidas de letras maiúsculas diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo para uma dada concentração de As; as letras minúsculas diferentes dizem respeito à existência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias nas diversas concentrações de As para um dado dia.

Da análise da Figura 38 pode-se verificar que existe uma diminuição significativa da percentagem de redução de ascorbato na parte aérea no tratamento de 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As ao longo do tempo, que está em consonância com o aumento da concentração de DAsA nas plantas neste tratamento e é semelhante ao comportamento da percentagem de redução de ASC na raiz, apontando para a possibilidade de que o ciclo do ascorbato-glutationa tenha deixado de funcionar eficientemente nestas plantas. Contudo, não houve diferenças significativas da percentagem de redução do ASC na parte aérea entre tratamentos e controlo no mesmo tempo de exposição ao As. Também à semelhança do que aconteceu com a raiz, a percentagem de redução de ASC na parte aérea do tratamento de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As apresentou diferenças significativas entre o observado no dia 20 e nos dias 10 e 30.

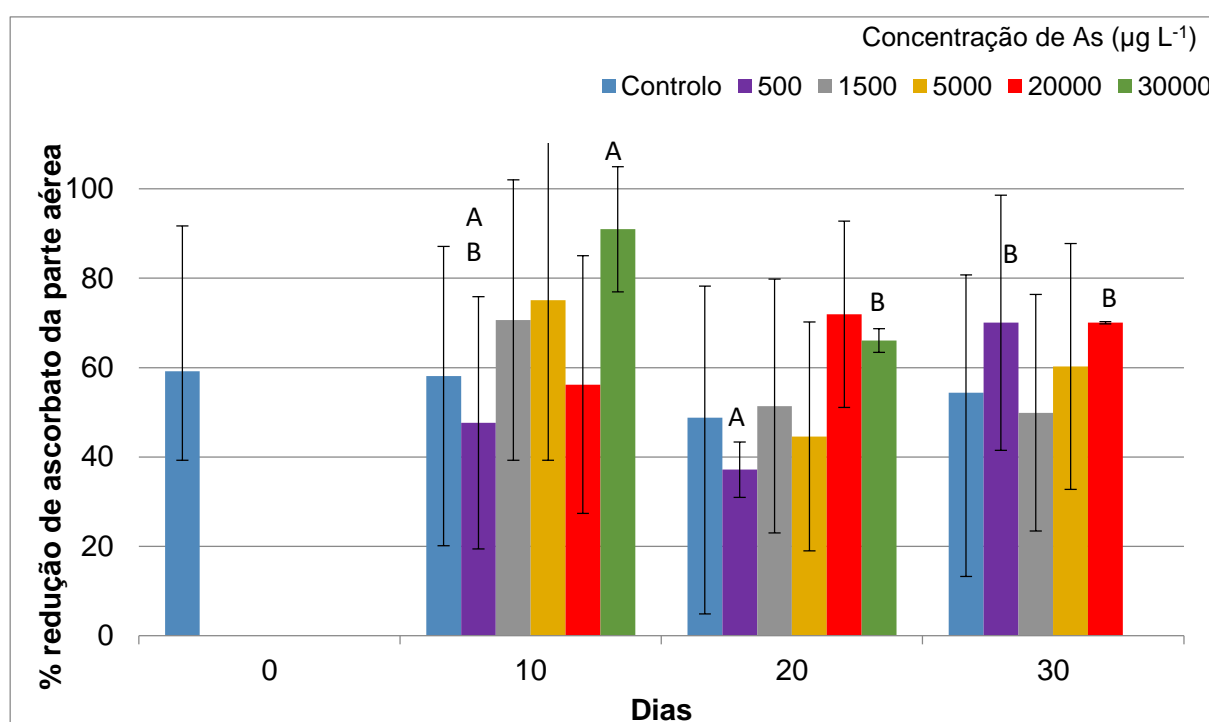


Figura 38 – Percentagem de redução de ascorbato na parte aérea das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante 30 dias.

Nota: médias seguidas de letras maiúsculas diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo para uma dada concentração de As; não há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias nas diversas concentrações de As para um dado dia.

Tal como aconteceu no ascorbato (à exceção do DAsA que não sofreu alterações), no controlo ao longo do tempo as concentrações de glutathione total, GSH e GSSG sofreram variações (diminuições e aumentos) significativas na raiz e na parte aérea, indicando que estas concentrações estão normalmente em constante alteração na planta, pelo que é difícil estabelecer uma relação com a concentração de As na planta (Figuras 39 a 42, Anexo XIII). Também existiram diferenças significativas ao longo do tempo para os tratamentos com as



concentrações 500, 15000 e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As, porém houve uma tendência para diminuição das concentrações de glutathiona.

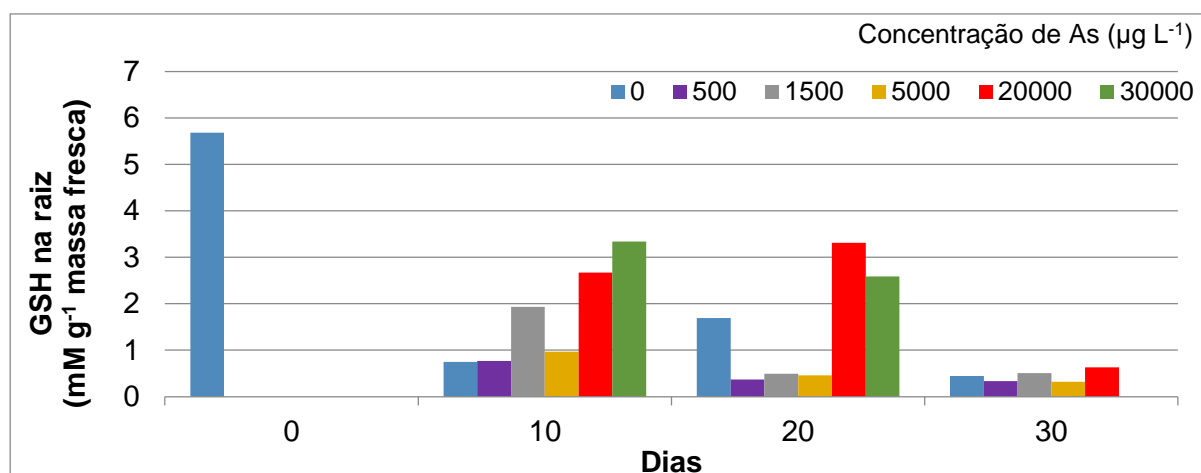


Figura 39 – Concentração média de GSH quantificada na raiz das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias.

Nota: valores e diferenças significativas no Anexo XIII.

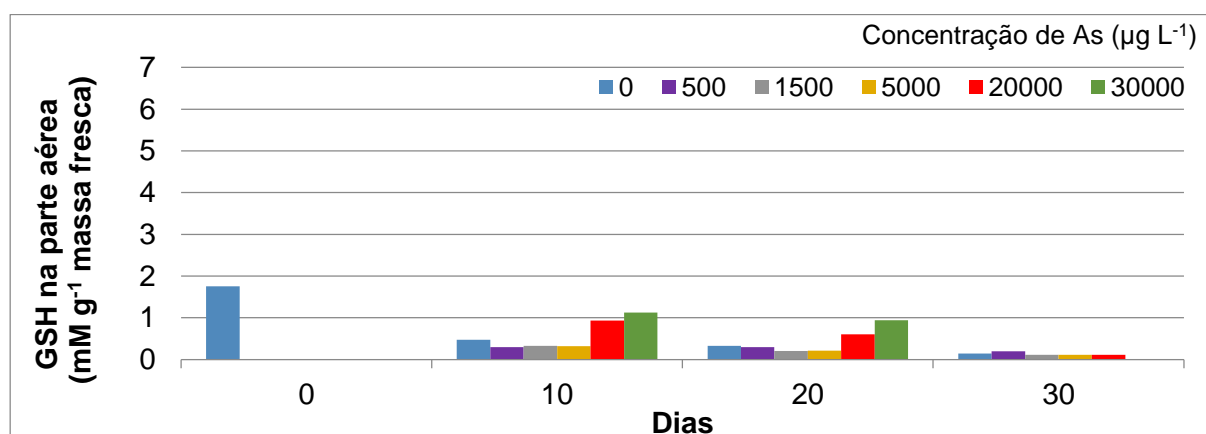


Figura 40 – Concentração média de GSH na parte aérea das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias.

Nota: valores e diferenças significativas no Anexo XIII.

Apesar de no final do período de ensaio não haver diferenças significativas entre as concentrações de GSSG e GSH na raiz e na parte aérea para os tratamentos com diferentes concentrações de As, os dois tratamentos com a concentração mais elevada de As apresentaram valores significativamente superiores em relação ao controlo ao fim de 10 e 20 dias, e ao fim de 30 dias o valor obtido para o tratamento de 20000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As foi maior mas não significativo. No estudo conduzido por Brossa *et al.* (2015) a concentração

de glutathione nas folhas de *Cistus albidus* também aumentou, mas em resposta ao stresse hídrico.

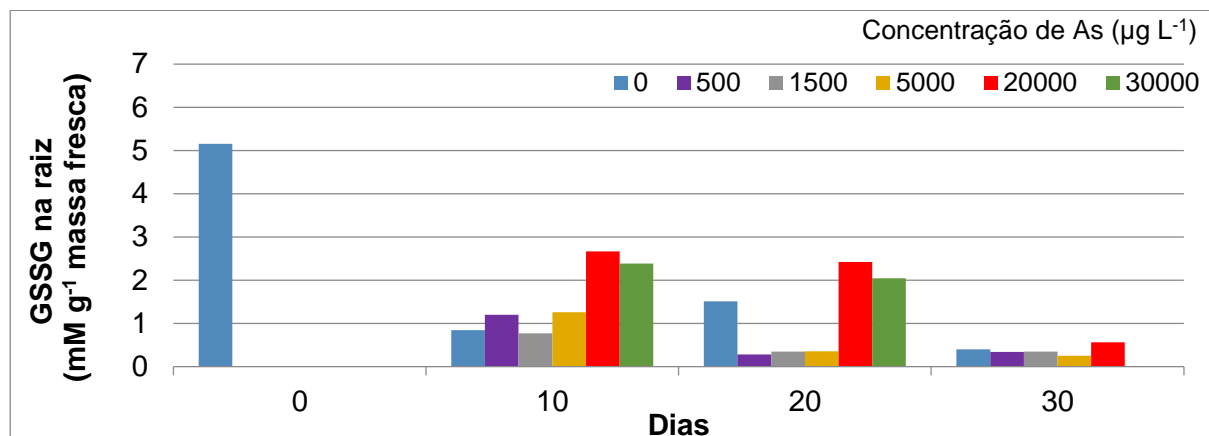


Figura 41 – Concentração média de GSSG quantificada na raiz das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias.

Nota: valores e diferenças significativas no Anexo XIII.

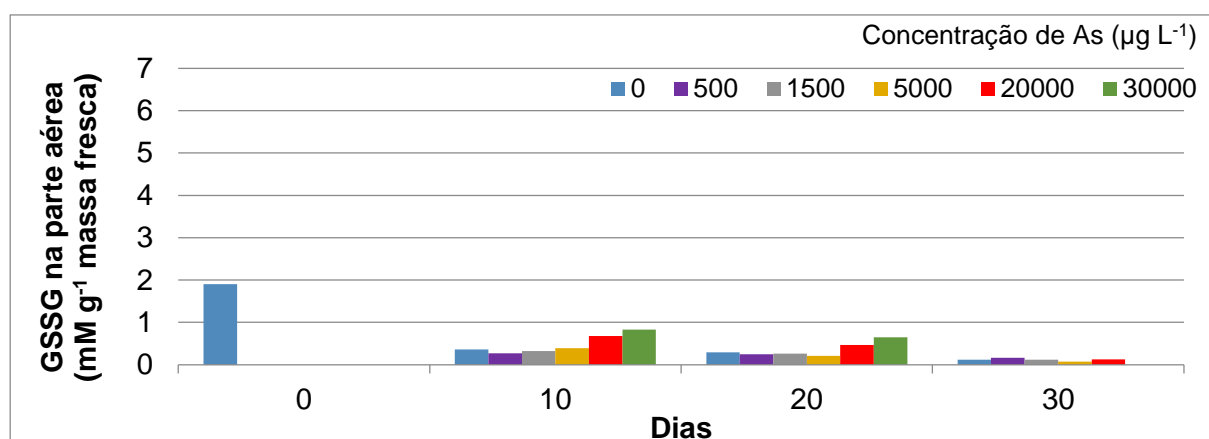


Figura 42 – Concentração de GSSG quantificada na parte aérea das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante trinta dias.

Nota: valores e diferenças significativas no Anexo XIII.

Contudo, obtiveram-se correlações positivas significativas e fortes entre GSSG ( $r=0,83$ ) e GSH ( $r=0,94$ ) na raiz e a concentração de As na raiz e na parte aérea das plantas no final do ensaio (Anexo XVI). Para a parte aérea, também se obtiveram correlações positivas significativas e fortes entre a concentração de glutathione total ( $r=0,94$ ), GSSG ( $r=0,89$ ) e GSH ( $r=0,94$ ) e a concentração de As na planta, de onde se pode concluir que o As desencadeou o mecanismo de defesa antioxidante da planta.

Uma baixa percentagem de redução de glutathione funciona como um sinal para a ativação da resposta ao stresse oxidativo. A percentagem de redução de glutathione na raiz e

na parte aérea no controlo foi baixa, assim como nos tratamentos, o que indica uma prontidão imediata para a resposta ao stresse oxidativo. Esta baixa relação GSH-GSSG foi também observada no controlo de plantas de *Cistus monspeliensis* expostas a concentrações elevadas de Zn (Arenas-Lago *et al.*, 2016).

A Figura 43 ilustra a variação da percentagem de redução de glutathiona da raiz. Apenas se observaram diferenças significativas entre os tratamentos de diferentes concentrações de As ao fim de 10 dias de duração do ensaio, tendo-se verificado que a percentagem de redução de glutathiona nos tratamentos de 1500 e 30000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de As foi significativamente maior relativamente ao controlo.

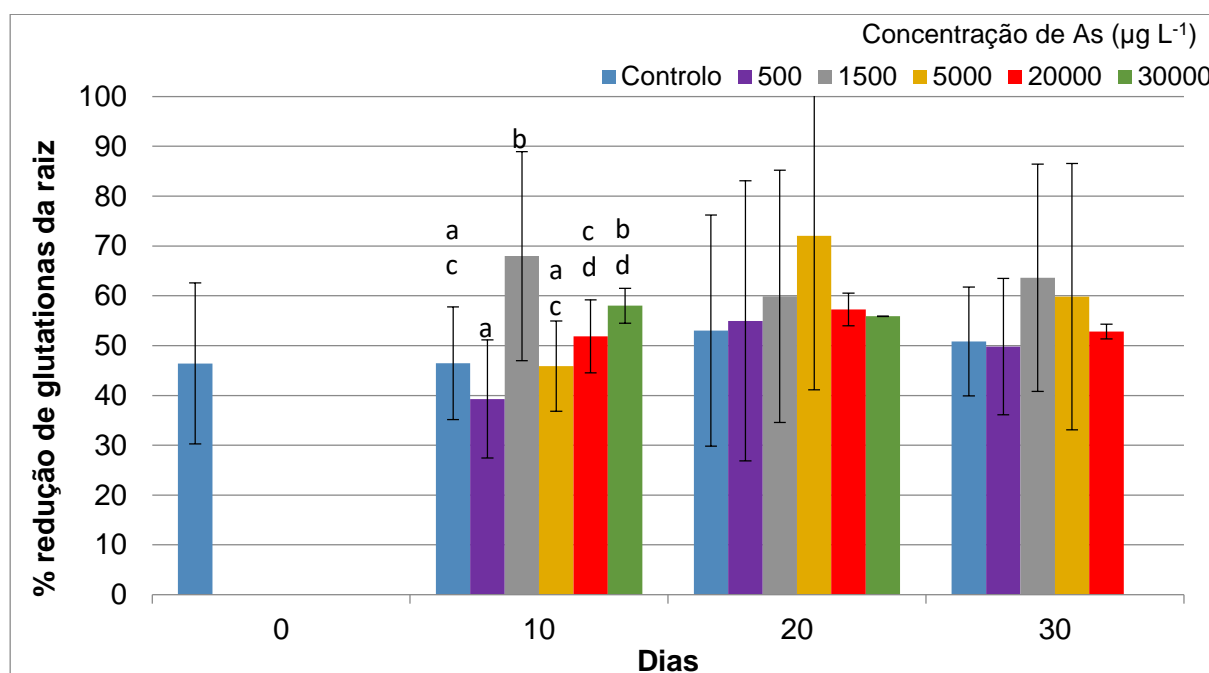


Figura 43 – Percentagem de redução de glutathiona na raiz das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante 30 dias.

Nota as letras minúsculas diferentes dizem respeito à existência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias nas diversas concentrações de As para um dado dia; não há médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo para uma dada concentração de As.

A percentagem de redução de glutathiona na parte aérea só apresentou diferenças significativas no controlo ao longo do tempo o que está de acordo com as variações observadas nas concentrações de glutathiona total, GSH e GSSG (Figura 44).

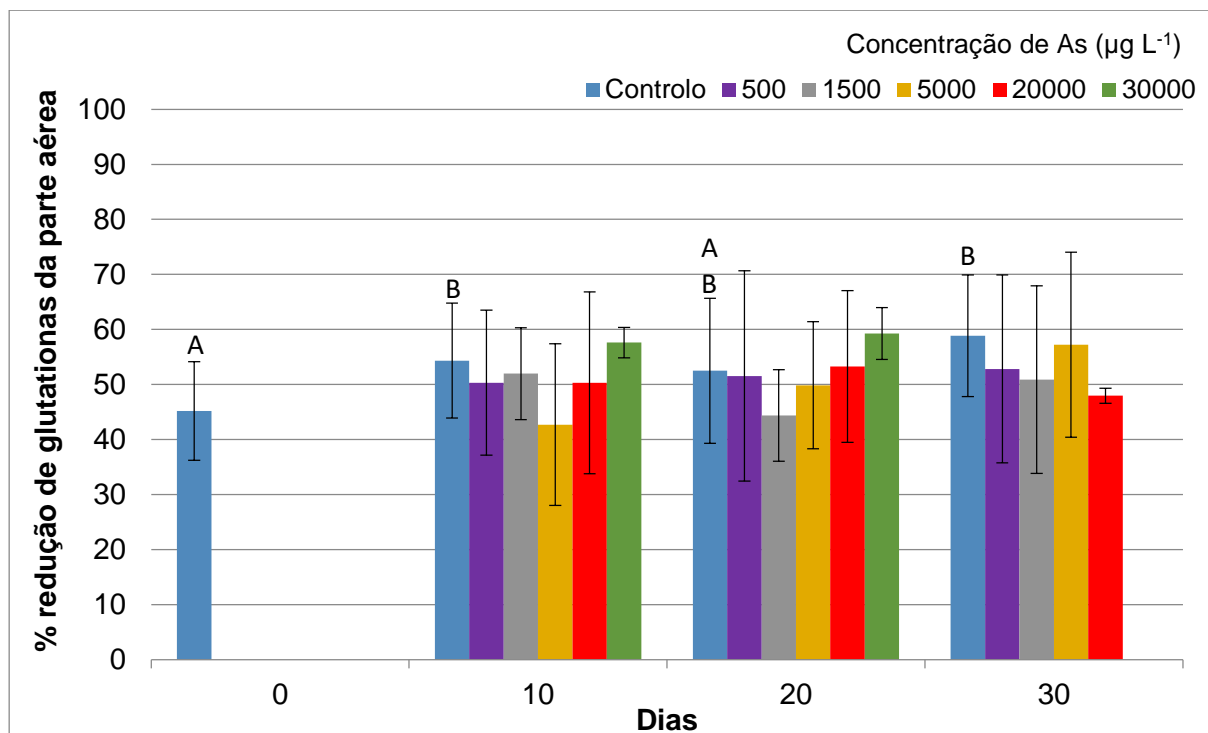


Figura 44 – Percentagem de redução de glutatona na parte aérea das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de As durante 30 dias.

Nota: médias seguidas de letras maiúsculas diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo para uma dada concentração de As; não há diferenças entre as médias nas diversas concentrações de As para um dado dia.

Em suma, as concentrações de AsA e de GSH na planta no final no ensaio foram um indicador da existência de stresse oxidativo devido à correlação forte e positiva com a concentração de As na planta.

## 5. Conclusões

As plantas estudadas apresentaram uma capacidade de germinação moderada em soluções ácidas, o que indica que podem germinar em solos ácidos, típicos de áreas mineiras. A sua taxa de germinação variou entre 20 e 45%, registada nas soluções com valores de pH 3 e pH 5 respetivamente. Apesar de existirem diferenças significativas não foi possível associar essas diferenças da média da taxa de germinação com o valor do pH.

O pH da solução aquosa não influenciou o comprimento da raiz, mas influenciou o comprimento do caule (as plantas germinadas a valores de pH mais baixos apresentaram comprimentos de caule mais pequenos, à exceção do controlo). Em ambos os casos, os comprimentos máximos foram observados no tratamento com pH 6 e os mínimos nos tratamentos com pH 3. O pH também não influenciou o comprimento da maior folha, tendo sido registado o maior comprimento no tratamento com o valor de pH 5.

Do teste de germinação de *C. salviifolius* em soluções aquosas com diferentes concentrações de As concluiu-se que a taxa de germinação não dependeu da concentração de As. O seu valor variou entre 10% (25  $\mu\text{g As L}^{-1}$ ) e 45% (500  $\mu\text{g As L}^{-1}$ ).

A concentração de As na solução aquosa dos diferentes tratamentos não influenciou o comprimento da raiz, o comprimento do caule e o comprimento da maior folha da planta, apesar de haver diferenças estatisticamente significativas das médias entre os diferentes tratamentos com As e o controlo, não houve uma relação linear entre os comprimentos dos diferentes órgãos e a concentração de As na solução de hidroponia. Os valores da massa fresca e do teor em água das plantas também não variaram com o teor em As na solução, e não houve diferenças significativas entre os tratamentos e o controlo.

Em suma, as taxas de germinação obtidas nos dois testes (pH e concentração de As) apresentaram valores dentro da mesma gama, e tanto o valor de pH como a concentração de As não influenciaram significativamente a germinação e os parâmetros de crescimento analisados.

Da análise química, conclui-se que o *C. salviifolius* acumulou maior quantidade de As na raiz do que na parte aérea, e que esta aumentou com a concentração de As no tratamento em hidroponia. Verificou-se ainda que, para concentrações de As iguais ou superiores a 20000  $\mu\text{g As L}^{-1}$  a planta transcolou maior quantidade de As para a parte aérea e que os mecanismos de remoção de ROS na planta não foram suficientes para eliminar o stresse oxidativo provocado pelas elevadas concentrações de As. Como resultado, as plantas expostas a estes tratamentos começaram a demonstrar sinais de toxicidade, apresentando necrose progressiva das folhas, o que conduziu à morte das plantas.

Em relação ao efeito da concentração de As sobre a absorção/acumulação dos elementos químicos analisados concluiu-se que:

- a concentração de Ca na raiz e na parte aérea das plantas submetidas aos dois tratamentos com as concentrações mais elevadas de As aumentou;
- a concentração de Mg na parte aérea das plantas submetidas aos dois tratamentos com as concentrações mais elevadas de As aumentou;
- a concentração de Fe na parte aérea das plantas submetidas aos dois tratamentos com as concentrações mais elevadas de As aumentou;
- a concentração de K na raiz das plantas submetidas aos dois tratamentos com as concentrações mais elevadas de As diminuiu;
- existe uma correlação positiva entre a concentração de As e a concentração de Zn na raiz.

No que diz respeito ao efeito do As sobre o crescimento das plantas no ensaio de hidroponia, concluiu-se o seguinte:

- concentrações de As iguais ou superiores a 20000  $\mu\text{g L}^{-1}$  afetaram o comprimento da raiz (menor crescimento da raiz);
- a concentração de 30000  $\mu\text{g As L}^{-1}$  afetou o comprimento da parte aérea (menor crescimento da parte aérea);
- concentrações de As iguais ou superiores a 20000  $\mu\text{g L}^{-1}$  afetaram a massa fresca total (diminuição da massa fresca ao longo do tempo);
- concentrações de As iguais ou superiores a 20000  $\mu\text{g L}^{-1}$  afetaram a massa fresca da raiz e a massa fresca da parte aérea (diminuição da massa fresca);
- concentrações até 5000  $\mu\text{g As L}^{-1}$  levaram a um aumento de massa seca da parte aérea, e concentrações de As iguais ou superiores a 20000  $\mu\text{g L}^{-1}$  conduziram a uma diminuição de massa seca da parte aérea;
- concentrações de As iguais ou superiores a 20000  $\mu\text{g L}^{-1}$  levaram a uma diminuição do número de folhas;
- concentrações de As iguais ou superiores a 20000  $\mu\text{g L}^{-1}$  conduziram a uma diminuição de área foliar ao longo do tempo.

O As não interferiu na capacidade fotossintética da planta, pois não se observaram diferenças significativas nos teores de clorofila *a*, *b* e total entre as médias dos diferentes tratamentos e com o controlo, ao fim de 30 dias de tratamento. Em todas as situações os valores obtidos para as plantas na solução de hidroponia com a concentração mais elevada de As foram os mais baixos.

No que diz respeito à concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , esta foi maior na raiz do que na parte aérea. A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na parte aérea ao fim de 20 dias de tratamento nas duas

concentrações mais elevadas de As aumentou significativamente em relação ao controlo, seguida de uma diminuição nos 10 dias seguintes, o que indica que a planta acionou os mecanismos de remoção de ROS conseguindo remover parte de  $H_2O_2$  produzido.

A concentração de ASC total, AsA e DAsA na raiz foi sempre maior do que na parte aérea das plantas, o mesmo se verificou na concentração de glutathione total, GSH e GSSG, o que possivelmente indica uma resposta à concentração de  $H_2O_2$  nas raízes.

No final do ensaio, a concentração de As na planta teve uma correlação positiva e forte com as concentrações de AsA, GSSG e GSH na parte aérea, e de GSSG e GSH na raiz, embora não relacionada com a concentração de  $H_2O_2$ , sugerindo que outra espécie de ROS possa estar envolvida no stresse oxidativo.

As percentagens de redução de ascorbato e glutathione na raiz apresentaram diferenças significativas entre tratamentos ao fim de 20 dias de ensaio, cuja variação não permitiu tirar ilações da sua relação com a concentração de As nos tratamentos, nem com a concentração de  $H_2O_2$ . Na parte aérea, estes parâmetros não variaram entre tratamentos, observando-se uma diminuição da percentagem de redução de ascorbato no tratamento de  $30000 \mu g As L^{-1}$ , apontando para a possibilidade de que o ciclo do ascorbato-glutathione tenha deixado de funcionar eficientemente nestas plantas. Contudo, a percentagem de redução de glutathione na parte aérea não revelou diferenças significativas entre tratamentos e controlo, ou nos tratamentos ao longo do tempo. Foi nas plantas submetidas ao As durante 10 dias que se observaram diferenças na percentagem de redução de glutathione na raiz, não se obtendo uma relação significativa entre ascorbato, glutathione e  $H_2O_2$ .

O *C. salviifolius* é uma espécie capaz de germinar em solos ácidos (a partir de valores de pH 2,5) e com elevadas concentrações de As (pelo menos até  $3000 \mu g L^{-1}$ ), característico de áreas mineiras. Esta planta revelou elevada tolerância ao As até à concentração de  $5000 \mu g L^{-1}$ , acumulando este metaloide principalmente na raiz, o que, aliado à sua capacidade adaptativa a ambientes degradados a tornam numa espécie com elevada potencialidade para ser utilizada em programas de fitoestabilização de solos das regiões mediterrânicas incluindo os das áreas mineiras fortemente contaminados com As.

## 6. Referências Bibliográficas

Abreu, M., Santos, A., Magalhães, M., Nabais, C. (2009). *Capacidade de absorção do chumbo por plantas do género Cistus espontâneas em ambientes mineiros*. Revista de Ciências Agrárias, 32: 170-181.

Abreu, M., Magalhães, M. (2009). *Phytostabilization of soils in mining areas. Case studies from Portugal*. In Soil remediation. Aachen, L., Eichmann, P. (Eds.). Nova Science Publishers, Inc.. New York.

Abreu, M., Santos, E., Fernandes, E., Batista, M., Ferreira, M. (2011). *Acumulação e translocação de elementos vestigiais em Cistus ladanifer L. de áreas mineiras da FPI portuguesa*. Revista de Ciências Agrárias, 34: 44-56.

Abreu, M., Santos, E., Ferreira, M., Magalhães, M. (2012a). *Cistus salviifolius a promising species for mine wastes remediation*. Journal of Geochemical Exploration, 113: 86-93.

Abreu, M., Santos, E., Magalhães, M., Fernandes, E. (2012b). *Trace elements tolerance, accumulation and translocation in Cistus populifolius, Cistus salviifolius and their hybrid growing in polymetallic contaminated mine áreas*. Journal of Geochemical Exploration, 123: 52-60.

Adriano, D. (2001). *Trace elements in the terrestrial environment. Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals*. 2nd edition. Springer. New York.

Agostinho, S. (2013). *Reabilitação da área mineira de São Domingos através da utilização de correctivos e a resposta fisiológica de Cistus salviifolius L. nos diferentes tratamentos aplicados*. Dissertação de Mestrado – Instituto Superior de Agronomia - UTL.

Albert, L. (1988). *Curso básico de toxicologia Ambiental*. 2nd edition. Editorial Limusa. Balderas.

Alkorta, J., Hernandez-Allica, J., Becerril, J., Amezaga, I., Albizu, I., Garbis, C. (2004). *Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic*. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 3: 71–90.

Amazonas, I., Soares, W., Almeida, C., Uchikawa, R. (2008). *Modelagem da estimativa da área foliar da mangueira (Mangifera indica L.)*. VIII ERMAC - 8º Encontro Regional de



Matemática Aplicada e Computacional. 20-22 de Novembro de 2008. Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Natal/RN.

Anderson, J., Chevone, B., Hess, J. (1992). *Seasonal variation in the antioxidant system of eastern white pine needles: evidence for thermal dependence*. Plant Physiology, 98: 501–508.

Anjum, N., Ahmad, I., Mohmood, I., Pacheco, M., Duarte, A., Pereira, E., Umar, S., Ahmad, A., Khan, N., Iqbal, M. (2012). *Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids – A review*. Environmental and Experimental Botany, 75: 307–324.

Anawar, H., Freitas, M., Canha, N., Regina, I. (2011). *Arsenic, antimony, and other trace element contamination in a mine tailings affected area and uptake by tolerant plant species*. Environmental Geochemistry and Health, 33: 353–362.

Anawar, H., Garcia-Sanchez, A., Murciego, A., Buyolo, T. (2006). *Exposure and bioavailability of arsenic in contaminated soils from the La Parrilla mine, Spain*. Environmental Geology, 50: 170–179.

Apel, K., Hirt, H. (2004). *Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. Annual Review of Plant Biology, 55: 373–399.

Arenas-Lago, D., Carvalho, L., Santos, E., Abreu, A. (2016). *The physiological mechanisms underlying the ability of Cistus monspeliensis L. from São Domingos mine to withstand high Zn concentrations in soils*. Environmental and Experimental Botany, 129: 219–227.

Baronia, F., Boscagli, A., Di Lella, L., Protano, G., Riccobono, F. (2004). *Arsenic in soil and vegetation of contaminated areas in southern Tuscany (Italy)*. Journal of Geochemical Exploration, 81: 1–14.

Bech, J., Abreu, M. M., Chon, Hyo-Taek, Roca, N., 2014. *Remediation of Potentially Toxic Elements in Contaminated Soils*. In Potentially harmful elements in the environment and the impact on human health. Bini, C. and Bech, J. (Eds), Springer, Dordrecht.

Binagre, P., Aguiar C., Espírito-Santo, D., Arsénio, P., Monteiro-Henriques, T. [Coord.s Cient.] (2007). *Guia de Campo – As árvores e os arbustos de Portugal continental*. In Coleção Árvores e Florestas de Portugal. Dea Sande S. (Coord. Ed.). Jornal Público/Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento/ Liga para a Protecção da Natureza. 9 vols. Lisboa.

Borges, A., Almeida, V. (1992). *Restauração da vegetação em zonas semi-áridas – Estudo da estratégia germinativa em espécies de Cistáceas*. Encontro sobre montados de sobro e azinho. Évora. pp 336–344.

Bradford, M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding*. Analytical Biochemistry, 72: 248–254.

Brossa, R., Pintó-Marijuan, M., Francisco, R., Lopez-Carbonell, M., Chaves, M., Alegre, L. (2015). *Redox proteomics and physiological responses in Cistus albidus shrubs subjected to long-term summer drought followed by recovery*. Planta, 241: 803–822.

Carbonell-Barrachina, A., Burlo-Carbonell, F., Mataix-Beneyto, J. (1995). *Arsenic uptake, distribution, and accumulation in tomato plants: effects of arsenite on plant growth and yield*. Journal of Plant Nutrition 18: 1237–1250.

Carrascosa, C., Castrillón, B. (2008). *Guia da flora e vegetação do Andévalo- Faixa pirítica Espanha-Portugal*. Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente.

Carvalho, L., Vilela, B., Vidigal, P., Mullineaux, P., Amâncio, S. (2006). *Activation of the ascorbate–glutathione cycle is an early response of micropropagated Vitis vinifera L. explants transferred to ex vitro*. International Journal of Plant Sciences, 167: 739–50.

Carvalho, L., Santos, S., Vilela, B., Amâncio, S. (2008). *Solanum lycopersicon Mill. and Nicotiana benthamiana L. under high light show distinct responses to anti-oxidative stress*. Journal of Plant Physiology, 165: 1300–1312.

Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Garmendia F. M., Navarro, C., Paiva, J., Soriano, C. (1993). *Flora Ibérica – Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Vol. III – Plumbaginaceae (partim). Capparaceae. Real Jardín Botánico. CSIC, Madrid.

Chang, R. (1994). *Química*. 5ª edição. McGraw-Hill.

Choi, W., Toyota, M., Kim, S., Hilleary, R., Gilroy, S. (2014). *Salt stress-induced Ca<sup>2+</sup> waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111: 6497–6502.

Correia, O., Ascensão, L. (2017). *Summer semi-deciduous species of the mediterranean landscape. A winning Strategy of Cistus Species to face the Predicted Changes of the*

*Mediterranean Climate*. In Plant biodiversity: monitoring, assessment and conservation. Ansari, A., Gill, S., Abbas, Z., Naeem, M., (Eds.). CAB International.

De la Fuente, V., Rufo, L., Rodríguez, N., Amils, R., Zuluaga, J. (2010). *Metal accumulation screening of the Río Tinto flora (Huelva, Spain)*. Biological Trace Element Research, 134: 318–341.

Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto. Diário da República, 1ª série A – N.º 176.

Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto. Diário da República, 1ª série – N.º 164.

Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000 que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. L 327.

EPA (2000). *Introduction to Phytoremediation*. U.S. Environmental Protection Agency. Reporte. EPA/600/R-99/107. Ohio.

Fernandes, F., Carvalho, L. (2003). *Portugal Botânico de A a Z – Plantas portuguesas e Exóticas*. Lidel – edições técnicas, Lda, Lisboa.

Franco, J. (1971). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores) – Volume I – Lycopodiaceae / Umbelliferae*. Sociedade Astória, Lda. Lisboa.

Freedman, B. (1995) *Environmental Ecology – The ecological effects of pollution, disturbance, and others stress*. 2nd edition. Academic Press. USA.

Frumkin, H., Thun, M. (2001). *Arsenic. CA: A Cancer*. Journal for Clinicians, 51: 254–262

García-Salgado, S., García-Casillas, D., Quijano-Nieto, M., Bonilla-Simón, M. (2012). *Arsenic and Heavy Metal Uptake and Accumulation in Native Plant Species from Soils Polluted by Mining Activities*. Water, Air and Soil Pollution, 223: 559–572.

Garcia-Sanchez, A., Alvarez-Ayuso, E. (2003). *Arsenic in soils and waters and its relation to geology and mining activities (Salamanca Province, Spain)*. Journal of Geochemical Exploration, 80: 69–79.

Ghoreishi, M., Hossini, Y., Maftoon, M. (2012). *Simple models for predicting leaf area of mango (Mangifera indica L.)*. Journal of Biology and Earth Sciences, 2: B45–B53.

González, G. (2007). *Guía de los árboles y arbustos de la Península Ibérica y Baleares*. 3ª Edición corregida. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

Guillonnet, G., Huon, A. (1992). *Connaître et Reconnaître La Flore et la végétation Méditerranéennes*. Éditions Ouest-France, Rennes.

Guo, W., Nazimc, H., Lianga, L., Yang, D. (2016). *Magnesium deficiency in plants: An urgent problem*. The Crop Journal, 4: 83 – 91.

Hall, J. (2002). *Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance*. Journal of Experimental Botany, 53: 1–11.

Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Voos, R., Ten Bookum, W., Schat, H., Meharg, A. (2001a). *Phytochlatins are involved in differential arsenate tolerance in Holcus lanatus*. Plant Physiology, 126: 299–306.

Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Meharg, A., (2001b). *Copper and arsenate induced oxidative stress in Holcus lanatus L. clones with differential sensitivity*. Plant, Cell & Environment, 24: 713–722.

Hiscox, J., Israelstam, G. (1979). *A method for extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration*. Canadian Journal of Botany, 57: 1332–1334.

Jiang, Z., Woollard, A., Wolff, S. (1990). *Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation*. FEBS Letters, 268: 69–71.

Kabata-Pendias, A. (2011). *Trace Elements in Soils and Plants*. 4th edition. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton.

Kirkby, E., Pilbeam, D. (1984). *Calcium as a plant nutrient*. Plant, Cell and Environment, 7: 397–405.

Lee, J., Lee, S., Chon, H., Kim, K. (2008). *Evaluation of human exposure to arsenic due to rice ingestion in the vicinity of abandoned Myungbong Au–Ag mine site, Korea*. Journal of Geochemical Exploration, 96: 231–235.

Lichtenthaler, H., Buschmann, C., Doll, M., Fietz, H., Bach, T., Kozel, U., Meir, D., Rahmsdorf, U. (1981). *Photosynthetic activity chloroplasts ultrastructure and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves*. Photosynthesis Research, 2: 115–141.

Ma, L., Komar, K., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., Kennelley, E. (2001). *A fern that hyperaccumulates arsenic*. Nature, 409: 579.

Machlis, L. (1941). *Accumulation of arsenic in shoots of sudangrass and bushbean*. Plant Physiology, 16: 521–543.

Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Awasthi, M., Lahori, A., Wang, Q., Li, I., Zhang, Z. (2016). *Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 126: 11–121.

Maldaner, I., Heldwein, A., Loose, L., Lucas, D., Guse, F., Bortoluzzi, M. (2009). *Modelos de determinação não-destrutiva da área foliar em girassol*. Ciência Rural, 39: 1356–1361.

Marin, A., Pezashki, S., Masschelen, P., Choi, H. (1993). *Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic, and photosynthesis of rice plants*. Journal of Plant Nutrition 16: 865–880.

Márquez-García, B., Pérez-López, R., Ruíz-Chancho, M., López-Sánchez, J., Rubio, R., Abreu, M., Nieto, J. Córdoba, F. (2012). *Arsenic speciation in soils and Erica andevalensis Cabezudo & Rivera and Erica australis L. from São Domingos Mine area, Portugal*. Journal of Geochemical Exploration, 119-120: 51–59.

McGrath, S., Zhao, F., Lombi, E. (2002). *Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides*. Advances in Agronomy, 75: 1–56.

Meharg, A., Hartley-Whitaker, J. (2002). *Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species*. New Phytologist, 154: 29–43.

Melo, R., Dias, L., Assis, I., Faria, A. (2007). *Influência do arsênio e fósforo sobre o crescimento de duas espécies florestais*. XXXI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. Serrano Centro de Convenções. Gramado. RS.

Mendez, M., Maier, R. (2008). *Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments*. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 7: 47–59.

Mengel, K., Kirkby, E. A. (2001). *Principles of plant nutrition*. 5th Edition. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

Mittler, R. (2002). *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. Trends in Plant Science 7: 405–410.

Mittler, R., Blumwald, E. (2015). *The Roles of ROS and ABA in Systemic Acquired Acclimation*. The Plant Cell, 27: 64–70.

- Moreira, B., Tavsanoğlu Ç., Pausas, J. (2012). *Local versus regional intraspecific variability in regeneration traits*. *Oecologia*, 168: 671–677.
- Moreira, J. (2008). *Árvores e Arbustos de Portugal*. Argumentum - Edições Estudos e Realizações. Lisboa.
- Moretti, M., Staehli, C., Gillet, F. (2008). *Determinants for the conservation of a vulnerable fire-dependent species at its marginal range*. *Plant Ecology*, 199: 89–98.
- Nakamura, S., Nitta, Y., Watanabe, M., Goto, Y. (2005). *Analysis of leaflet shape and area for improvement of leaf area estimation method for sago palm (Metroxylon sagu Rottb.)*. *Plant Production Science*, 8 (1): 27–31.
- Neff, J. (1997). *Ecotoxicology of arsenic in the marine environment*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 917–927.
- Núñez-Oliveira, E., Martínez-Abaigar, J.; Escudero, J., (1996). *Adaptability of leaves of Cistus ladanifer to Widely Varying Environmental Conditions*. *Functional Ecology*, 10: 636–646.
- Okamura, M. (1980). *An improved method for determination of L-ascorbic acid and L-dehydroascorbic acid in blood plasma*. *Clinica Chimica Acta*, 103: 259–268.
- Pedro, G., Santos, I. (1998). *Guia de Campo - Flores da Arrábida*. Instituto de conservação da Natureza – Parque Natural da arrábida.
- Pratas, J.; Favas, P., D’Souza, R., Varun, M., Paul, M. (2014). *Metais pesados em solos e vegetação espontânea da área de uma mina de chumbo, mina de Barbadalhos, Centro de Portugal*. *Comunicações Geológicas* 101, Especial II, pp 1047–1050. LNEG – Laboratório Nacional de Geologia e Energia IP.
- Puglielli, G., Varone, L., Gratani, L., Catoni, R. (2017). *Specific leaf area variations drive acclimation of Cistus salvifolius in different light environments*. *Photosynthetica*, 55: 31–40.
- Ramesh, K., Ramawat, N., Singh, V. (2007). *Leaf Area Distribution Pattern and Non-destructive Estimation Methods of Leaf Area for Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6: 1037–1043.
- Richardson, A., Duigan, S., Berlyn, G. (2002). *An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content*. *New Phytologist*, 153: 185–194.

Rossini, S. O., Mingorance, M., Valdés, B., Leidi, E. (2010). *Uptake, localization and physiological changes in response to copper excess in Erica andevalensis*. Plant and Soil, 328: 411–420.

Santos, E., Ferreira, M., Abreu, M. (2011). *Contribuição de Cistus ladanifer L. e Cistus salviifolius L. na recuperação de áreas mineiras da Faixa Piritosa Ibérica*. Revista de Ciências Agrárias, 34: 21–31.

Singh, N., Ma, L. (2007). *Assessing plants for phytoremediation of arsenic-contaminated soils*. In Phytoremediation, methods and reviews. Humana Press. Totowa.

Sinha, R., Sinha, R. (2008). *Environmental Biotechnology*. Aavishkar Publishers Distributors. Jaipur.

Shah, A., Kazi, T., Baig, J., Afridi, H. (2011). *Correlation Between Arsenic Concentration in Fishand Human Scalp Hair of People Living in Arsenic-Contaminated and Noncontaminated Areas of Pakistan*. Biological Trace Element Research, 144: 197–204.

Silva, M., Trevizam, A. (2015). *Interações iônicas e seus efeitos na nutrição das plantas*. Informações Agronômicas, 149.

Simões, M.; Madeira, M., Gazarini, L. (2009). *Ability of Cistus L. shrubs to promote soil rehabilitation in extensive oak woodlands of Mediterranean areas*. Plant and Soil, 323: 249–265.

Sneller, F., Heerwaarden, L., Kraaijeveld-Smit, F., Bookum, W., Koevoets, P., Schat, H., Verkleij, J. (1999). *Toxicity of arsenate in Silene vulgaris, accumulation and degradation of arsenate-induced phytochelatins*. New Phytologist, 144: 223–232.

Sousa, J., Peixoto, A., Toledo, F., Reichardt, K. (1998). *Enciclopédia Agrícola Brasileira*. Vol 2 C-D. EDUSP.

Steinhorst, L., Kudla, J. (2013). *Calcium and Reactive Oxygen Species Rule the Waves of Signaling*. Plant Physiology, 163: 471–485.

Tu, C., Ma, L. (2003). *Effects of arsenate and phosphate on their accumulation by an arsenic-hyperaccumulator Pteris vittata L.* Plant and Soil, 249: 373–382.

Turpeinen, R., Panssar-Kallio, M., Häggblom, M., Kairesalo, T. (1999). *Influence of microbes on the mobilization, toxicity and biomethylation of arsenic in soil*. Science of the Total Environment, 236: 173–180.

Vangronsveld, J., Herzig R., Weyens N., Boulet J., Adriaensen K., Ruttens A., Thewys T., Vassilev A., Meers E., Nehnevajova E., Van Der Lelie D., Mench M. (2009). *Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field*. Environmental Science and Pollution Research, 16: 765–794.

Varennas, A. (2003). *Produtividade dos solos e ambiente*. Escolar Editora, Lisboa.

Visoottiviseth, P., Francesconi, K., Sridokchan, W. (2002). *The potential of Thai indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land*. Environmental Pollution, 118: 453–461.

Williams, L., Martinson T. (2003). *Nondestructive leaf area estimation of 'Niagara' and 'DeChaunac' grapevines*. Scientia Horticulturae, 98: 493–498.

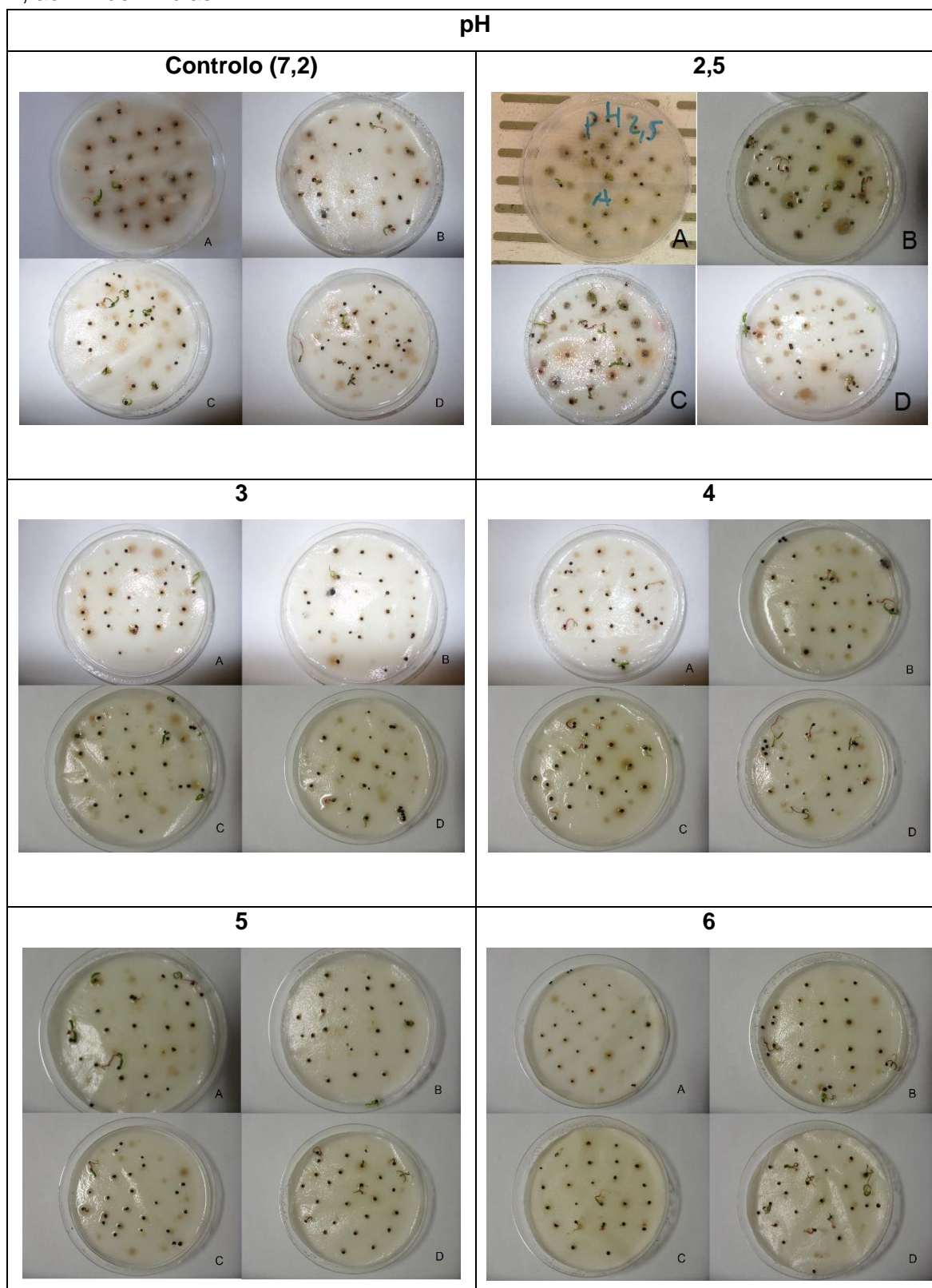
WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2001). *Arsenic and arsenic compounds*. Second edition. Environmental Health Criteria Series. n. 224. 187 p. Disponível em <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm>> [Consult. 11 de setembro 2017].

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1993). *Guidelines for Drinking-Water Quality*. 2nd edition. Vol. 1 – Recommendations. Disponível em <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq2v1/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq2v1/en/)> [Consult. 11 de setembro 2017].



## Anexos

**Anexo I** – Ensaio de germinação de *C. salviifolius* em soluções com diferentes valores de pH, ao fim de 21 dias.

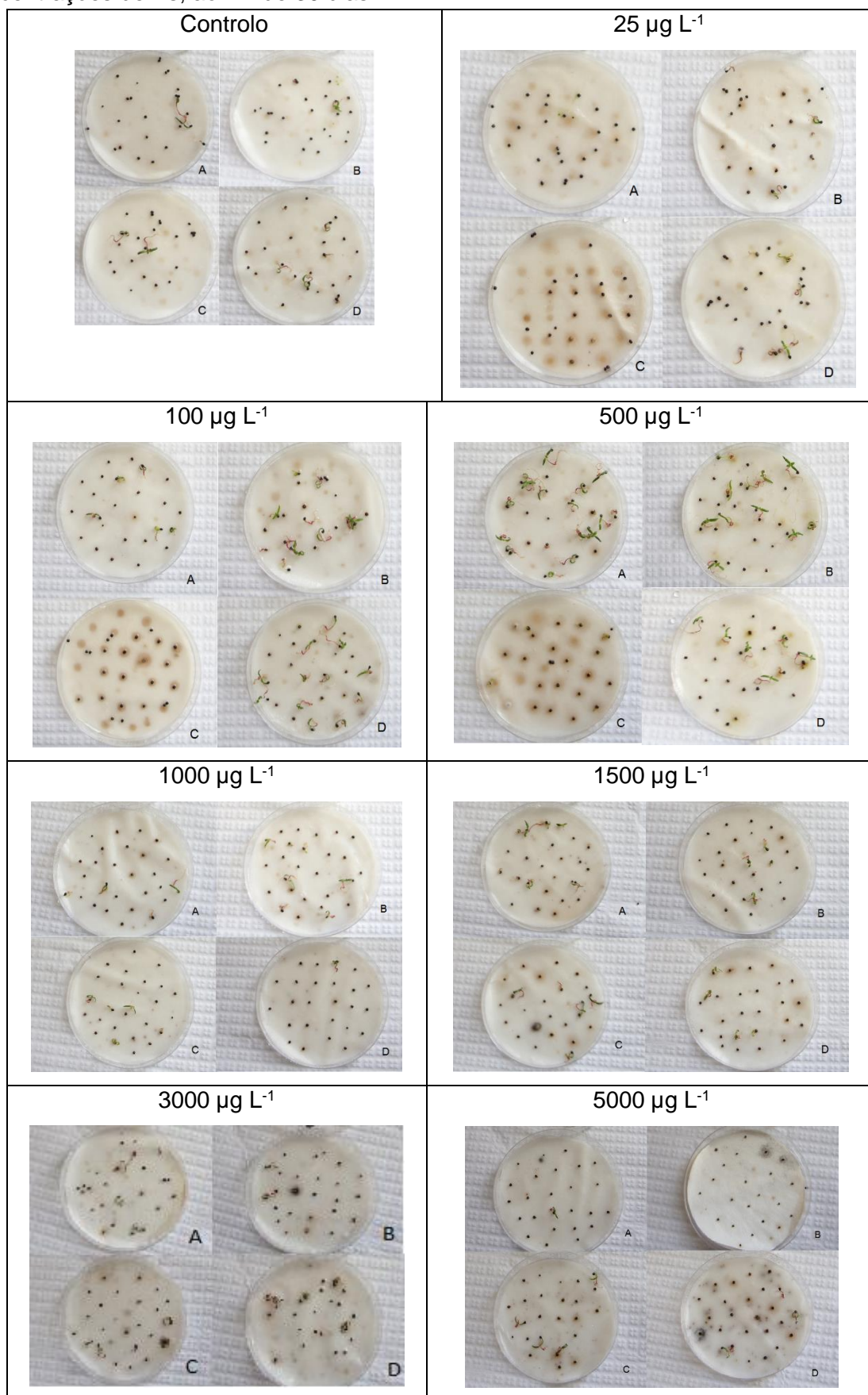


**Anexo II** – Valores médios e desvios-padrão da taxa de germinação final (21 dias), obtidos experimentalmente para soluções aquosas com diferentes valores de pH.

Tratamento	Taxa de germinação (%)
Controlo	29,0 ± 8,2 ab
pH 2,5	39,0 ± 8,2 ac
pH 3	20,0 ± 3,3 b
pH 4	31,0 ± 2,0 ac
pH 5	45,0 ± 13,6 c
pH 6	37,3 ± 19,7 ac

Nota: o controlo tem pH = 7,2; as médias seguidas pelas letras minúsculas iguais não diferem entre si, a 5% de significância; n=4.

**Anexo III** – Ensaio de germinação de *C. salviifolius* em soluções com diferentes concentrações de As, ao fim de 30 dias.



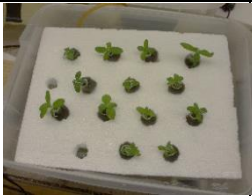






















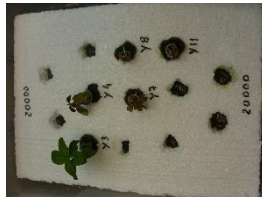
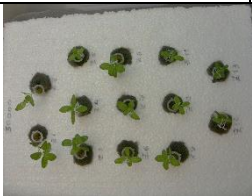



**Anexo IV** – Valores médios e desvios-padrão da taxa de germinação final (30 dias) obtidos experimentalmente para os diferentes tratamentos de As e controle.

Tratamento: Concentração de As ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Taxa de germinação (%)
Controlo	$17 \pm 12,8$ a
25	$10 \pm 12,0$ a
100	$32 \pm 21,4$ ab
500	$45 \pm 18,7,0$ b
1000	$18 \pm 11,5$ a
1500	$24 \pm 8,0$ ab
3000	$21 \pm 5,0$ ab
5000	$12 \pm 8,0$ a


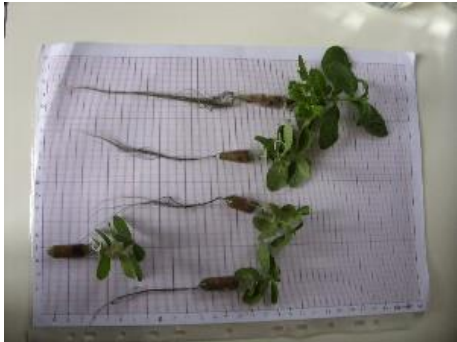
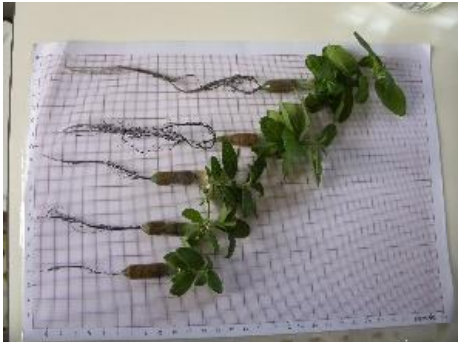
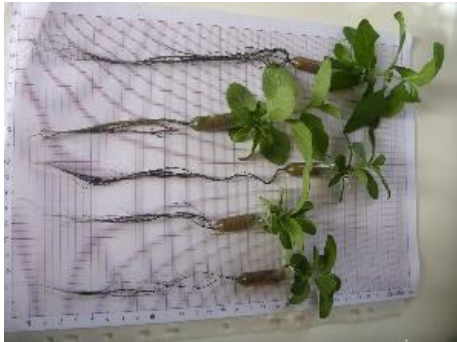



O controlo tem a concentração de  $0,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de As; as médias seguidas pelas letras minúsculas iguais não diferem entre si, a 5% de significância; n=4.



**Anexo V** – Ensaio de crescimento de *C. salvifolius* ao longo do tempo de tratamento com As.

As ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0 dias	10 dias	20 dias	30 dias
Controlo I				
500				
1500				
5000				
Controlo II				
20000				
30000				

**Anexo VI – Crescimento de *C. salviifolius* após 30 dias de tratamento com As.**

<p>Controlo I</p> 	<p>500 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></p> 
<p>1500 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></p> 	<p>5000 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></p> 
<p>Controlo II</p> 	
<p>20000 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></p> 	<p>30000 <math>\mu\text{g L}^{-1}</math></p> 

**Anexo VII** – Comprimento da raiz (média  $\pm$  desvio-padrão) de *C. salviifolius*, ao longo de 30 dias de ensaio em diferentes tratamentos de As.

Concentração de As ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Comprimento da raiz (mm)			
	Tempo (dias)			
	0	10	20	30
<b>Controlo</b>	67,8 $\pm$ 36,4 A	80,8 $\pm$ 34,2 a A	96,4 $\pm$ 31,2 ac AB	137,0 $\pm$ 44,1 a B
<b>500</b>	71,4 $\pm$ 37,7	67,6 $\pm$ 24,0	94,4 $\pm$ 45,8 ac	140,1 $\pm$ 63,0 ab
<b>1500</b>	75,5 $\pm$ 55,1	83,7 $\pm$ 37,0	123,3 $\pm$ 38,1 ab	142,0 $\pm$ 62,6 a
<b>5000</b>	84,8 $\pm$ 32,4 A	104,0 $\pm$ 20,0 AB	148,4 $\pm$ 33,4 b BC	203,2 $\pm$ 44,2 b C
<b>20000</b>	67,6 $\pm$ 28,2	67,9 $\pm$ 8,4	77,6 $\pm$ 21,6 cd	78,8 $\pm$ 19,2 c
<b>30000</b>	67,9 $\pm$ 39,1	62,0 $\pm$ 22,4	49,6 $\pm$ 10,6 d	51,9 $\pm$ 13,4 c

Na linha, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo para uma dada concentração de As. Na coluna, as letras minúsculas diferentes dizem respeito à existência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias nas diversas concentrações de As para um dado dia.  $n_{\text{controlo}}=10$ ,  $n_{\text{tratamento}}=5$ .

**Anexo VIII** – Comprimento da parte aérea (média  $\pm$  desvio-padrão) das plantas em estudo, ao longo de 30 dias de ensaio e expostas a diferentes tratamentos de As.

Concentração de As ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Comprimento da parte aérea (mm)			
	Tempo (dias)			
	0	10	20	30
<b>Controlo</b>	17,6 $\pm$ 3,9 A	24,5 $\pm$ 7,9 B	34,1 $\pm$ 12,4 C	46,9 $\pm$ 16,4 a C
<b>500</b>	19,9 $\pm$ 5,3 A	20,5 $\pm$ 7,2 A	29,8 $\pm$ 10,1 AB	36,6 $\pm$ 19,1 a B
<b>1500</b>	17,5 $\pm$ 5,2 A	22,6 $\pm$ 7,3 AB	29,6 $\pm$ 11,0 BC	39,4 $\pm$ 15,1 a C
<b>5000</b>	19,0 $\pm$ 4,8 AB	19,0 $\pm$ 7,5 A	29,4 $\pm$ 10,6 BC	44,4 $\pm$ 18,6 a C
<b>20000</b>	14,7 $\pm$ 3,3	18,4 $\pm$ 4,3	21,4 $\pm$ 6,4	22,7 $\pm$ 8,3 a
<b>30000</b>	15,1 $\pm$ 4,5	17,9 $\pm$ 4,7	17,7 $\pm$ 4,4	16,3 $\pm$ 4,4 b

Na linha, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo para uma dada concentração de As. Na coluna, as letras minúsculas diferentes dizem respeito à existência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias nas diversas concentrações de As para um dado dia.  $n_{\text{controlo}}=10$ ,  $n_{\text{tratamento}}=5$ .



**Anexo IX** – Massa fresca total (média  $\pm$  desvio-padrão) de *C. salviifolius*, ao longo de 30 dias de ensaio em diferentes tratamentos de As.

Concentração de As ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Massa fresca total (g)			
	Tempo (dias)			
	0	10	20	30
<b>Controlo</b>	0,50 $\pm$ 0,30	0,41 $\pm$ 0,27 ab	0,55 $\pm$ 0,37 a	0,75 $\pm$ 0,46 a
<b>500</b>	0,36 $\pm$ 0,33	0,52 $\pm$ 0,53 ab	0,58 $\pm$ 0,39 a	0,71 $\pm$ 0,54 a
<b>1500</b>	0,48 $\pm$ 0,35	0,68 $\pm$ 0,37 a	0,72 $\pm$ 0,57 a	0,83 $\pm$ 0,44 a
<b>5000</b>	0,33 $\pm$ 0,15	0,55 $\pm$ 0,28 a	0,71 $\pm$ 0,32 a	0,98 $\pm$ 0,49 a
<b>20000</b>	0,33 $\pm$ 0,09 A	0,23 $\pm$ 0,12 bc AB	0,16 $\pm$ 0,07 b B	0,14 $\pm$ 0,19 b B
<b>30000</b>	0,22 $\pm$ 0,07 A	0,14 $\pm$ 0,05 c AB	0,11 $\pm$ 0,05 b BC	0,05 $\pm$ 0,03 b C

Na linha, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo para uma dada concentração de As. Na coluna, as letras minúsculas diferentes dizem respeito à existência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias nas diversas concentrações de As para um dado dia.  $n_{\text{controlo}}=10$ ,  $n_{\text{tratamento}}=5$ .

**Anexo X** – Número médio de folhas e respetivo desvio-padrão ao longo do período de tratamento com As.

Concentração de As ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	N.º de folhas			
	Tempo (dias)			
	0	10	20	30
<b>Controlo</b>	9,2 $\pm$ 2,1 A	14,6 $\pm$ 5,8 B	26,4 $\pm$ 13,3 C	44,8 $\pm$ 20,0 a D
<b>500</b>	9,2 $\pm$ 1,1 A	13,8 $\pm$ 4,7 B	16,8 $\pm$ 9,7 B	28,6 $\pm$ 15,4 ab C
<b>1500</b>	10,4 $\pm$ 4,3 A	15,4 $\pm$ 10,0 AB	22,4 $\pm$ 14,3 BC	42,8 $\pm$ 33,2 ac C
<b>5000</b>	8,8 $\pm$ 1,1 A	12,4 $\pm$ 2,2 B	16,8 $\pm$ 7,6 B	34,8 $\pm$ 12,5 ac C
<b>20000</b>	8,8 $\pm$ 0,9 A	11,8 $\pm$ 1,5 B	15,0 $\pm$ 4,4 BC	18,6 $\pm$ 9,6 bc C
<b>30000</b>	8,8 $\pm$ 1,1 A	10,0 $\pm$ 1,4 AB	15,2 $\pm$ 7,0 B	16,0 $\pm$ 8,6 b B

Na linha, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo para uma dada concentração de As. Na coluna, as letras minúsculas diferentes dizem respeito à existência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias nas diversas concentrações de As para um dado dia.  $n_{\text{controlo}}=10$ ,  $n_{\text{tratamento}}=5$ .

**Anexo XI** – Valores da área foliar (média  $\pm$  desvio-padrão) de *C. salviifolius*, ao longo do período de tratamento com As (30 dias).

Concentração de As ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Área foliar ( $\text{cm}^2$ )			
	Tempo (dias)			
	0	10	20	30
<b>Controlo</b>	1,2 $\pm$ 1,0	1,6 $\pm$ 1,1 ab	1,7 $\pm$ 1,2 a	1,7 $\pm$ 1,3 a
<b>500</b>	1,1 $\pm$ 0,7	1,6 $\pm$ 1,3 ab	1,8 $\pm$ 1,2 ab	1,7 $\pm$ 1,3 a
<b>1500</b>	1,3 $\pm$ 0,6	2,4 $\pm$ 1,3 a	2,6 $\pm$ 1,5 ab	2,5 $\pm$ 1,5 a
<b>5000</b>	1,2 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 1,3 a	3,1 $\pm$ 1,7 b	2,8 $\pm$ 1,7 b
<b>20000</b>	0,8 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,3 bc	0,7 $\pm$ 0,3 c	0,6 $\pm$ 0,2 c
<b>30000</b>	0,9 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,3 c	0,5 $\pm$ 0,2 c	0,4 $\pm$ 0,2 c

Não há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo para uma dada concentração de As. As letras minúsculas dizem respeito à existência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as diversas concentrações de As para um dado dia.  $n_{\text{controlo}}=10$ ,  $n_{\text{tratamento}}=5$ .

**Anexo XII** – Concentração de ascorbato total (ASC), oxidado (DAsA) e reduzido (AsA) (média  $\pm$  desvio-padrão) na raiz e na parte aérea das plantas de *C. salviifolius* expostas aos diferentes tratamentos com As, ao longo do período de ensaio.

Tratamento ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Concentração de ascorbato ( $\mu\text{M g}^{-1}$ massa fresca)											
	0 dias			10 dias			20 dias			30 dias		
	ASC total	DAsA	AsA	ASC total	DAsA	AsA	ASC total	DAsA	AsA	ASC total	DAsA	AsA
<b>controle</b>												
raiz	22,75 $\pm$ 12,07 A	4,36 $\pm$ 4,91 A	19,86 $\pm$ 15,74 A	16,18 $\pm$ 9,55 ab A	9,76 $\pm$ 10,52	5,31 $\pm$ 6,17 a BC	26,39 $\pm$ 23,51 ac A	12,60 $\pm$ 12,12 ab	14,55 $\pm$ 20,56 ad AB	6,05 $\pm$ 4,43 B	3,54 $\pm$ 4,35	2,12 $\pm$ 1,25 C
parte aérea	13,39 $\pm$ 3,99 A	5,90 $\pm$ 4,37	7,08 $\pm$ 3,62 A	12,81 $\pm$ 8,70 ac AB	6,35 $\pm$ 6,73 a	6,46 $\pm$ 4,73 a A	8,81 $\pm$ 5,49 ab B	5,40 $\pm$ 5,34	3,41 $\pm$ 2,26 a B	3,21 $\pm$ 2,08 C	1,87 $\pm$ 1,86	1,34 $\pm$ 0,53 a C
<b>500</b>												
raiz	-	-	-	6,01 $\pm$ 2,68 a A	0,00 $\pm$ 0,00 A	5,04 $\pm$ 1,85 a A	15,14 $\pm$ 5,13 ab B	14,66 $\pm$ 4,95 ad B	0,48 $\pm$ 0,27 b B	5,81 $\pm$ 4,48 A	1,30 $\pm$ 1,50 A	4,82 $\pm$ 3,19 A
parte aérea	-	-	-	8,98 $\pm$ 6,36 ab	5,75 $\pm$ 6,87 ab AB	3,23 $\pm$ 3,03 b	9,42 $\pm$ 4,94 ab	5,86 $\pm$ 2,94 A	3,58 $\pm$ 2,07 a	4,05 $\pm$ 2,64	1,17 $\pm$ 1,55 B	2,88 $\pm$ 1,67 b
<b>1500</b>												
raiz	-	-	-	8,71 $\pm$ 3,71 a	4,57 $\pm$ 4,93	3,73 $\pm$ 4,86 a	9,45 $\pm$ 6,56 b	3,29 $\pm$ 6,81 bc	5,45 $\pm$ 6,09 c	6,75 $\pm$ 4,75	3,32 $\pm$ 3,68	3,42 $\pm$ 2,86
parte aérea	-	-	-	7,49 $\pm$ 4,97 ab	3,04 $\pm$ 3,69 ab	4,46 $\pm$ 2,61 ab A	6,48 $\pm$ 4,23 a	3,61 $\pm$ 2,82	2,87 $\pm$ 1,86 a AB	3,64 $\pm$ 1,95	2,10 $\pm$ 1,38	1,54 $\pm$ 0,87 ab B
<b>5000</b>												
raiz	-	-	-	15,53 $\pm$ 12,33 ab	8,18 $\pm$ 6,70	4,70 $\pm$ 4,70 a	10,07 $\pm$ 10,19 b	6,18 $\pm$ 5,61 abc	3,89 $\pm$ 5,03 ac	19,78 $\pm$ 19,53	17,98 $\pm$ 17,84	1,80 $\pm$ 1,71
parte aérea	-	-	-	5,00 $\pm$ 0,92 b	1,50 $\pm$ 2,28 b	3,50 $\pm$ 1,53 ab	6,27 $\pm$ 5,22 a	4,48 $\pm$ 5,40	1,79 $\pm$ 0,45 a	3,41 $\pm$ 1,26	1,60 $\pm$ 1,25	1,80 $\pm$ 0,36 ab
<b>20000</b>												
raiz	-	-	-	39,76 $\pm$ 22,47 bc	19,61 $\pm$ 20,99	20,15 $\pm$ 16,84 b	25,48 $\pm$ 3,39 c	2,62 $\pm$ 4,46 c	22,86 $\pm$ 3,68 d	6,27 $\pm$ 0,11	4,57 $\pm$ 0,04	1,70 $\pm$ 0,15
parte aérea	-	-	-	18,76 $\pm$ 6,48 d A	9,51 $\pm$ 7,76 a	9,24 $\pm$ 2,26 c	13,30 $\pm$ 2,64 b AB	3,43 $\pm$ 2,57	9,87 $\pm$ 4,56 b	3,37 $\pm$ 0,03 B	1,01 $\pm$ 0,02	2,36 $\pm$ 0,02 b
<b>30000</b>												
raiz	-	-	-	54,42 $\pm$ 30,35 c	38,13 $\pm$ 29,63	16,29 $\pm$ 3,73 b	70,11 $\pm$ 11,60 c	54,70 $\pm$ 11,10 d	15,41 $\pm$ 0,50 acd	-	-	-
parte aérea	-	-	-	16,22 $\pm$ 4,39 cd	1,14 $\pm$ 1,77 b A	15,08 $\pm$ 5,67 c	15,76 $\pm$ 0,22 b	5,35 $\pm$ 0,49 B	10,41 $\pm$ 0,27 b	-	-	-

Nota: médias seguidas de letras maiúsculas diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo para uma dada concentração de As; as letras minúsculas diferentes dizem respeito à existência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias nas diversas concentrações de As para um dado dia.

**Anexo XIII** – Concentração de glutatona total, oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) (média  $\pm$  desvio-padrão) na raiz e na parte aérea das plantas de *C. salviifolius* expostas aos tratamentos com diferentes concentrações de As, ao longo do período de ensaio.

		Concentração de glutatona ( $\mu\text{M g}^{-1}$ massa fresca)									
Tratamento	$(\mu\text{g L}^{-1})$	0 dias		10 dias			20 dias			30 dias	
		Glutatonas total	GSSG	GSH	Glutatonas total	GSSG	GSH	Glutatonas total	GSSG	GSH	GSSG
controle	raiz	10,84 $\pm$ 6,56 A	5,15 $\pm$ 2,38 A	5,68 $\pm$ 4,65 A	1,59 $\pm$ 0,56 a B	0,84 $\pm$ 0,34 a B	0,75 $\pm$ 0,37 ab B	3,01 $\pm$ 2,15 a C	1,51 $\pm$ 0,87 a C	1,69 $\pm$ 1,41 a C	0,40 $\pm$ 0,28
	parte aérea	3,65 $\pm$ 4,89 A	1,90 $\pm$ 2,46 A	1,75 $\pm$ 2,50 A	0,83 $\pm$ 0,42 ab B	0,36 $\pm$ 0,15 ab B	0,48 $\pm$ 0,29 a B	0,61 $\pm$ 0,29 a B	0,29 $\pm$ 0,16 a B	0,33 $\pm$ 0,19 a B	0,12 $\pm$ 0,11 C
500	raiz	-	-	-	1,97 $\pm$ 0,17 a A	1,20 $\pm$ 0,28 b A	0,77 $\pm$ 0,24 ab A	0,58 $\pm$ 0,27 b B	0,28 $\pm$ 0,12 b B	0,37 $\pm$ 0,35 b B	0,34 $\pm$ 0,13 B
	parte aérea	-	-	-	0,57 $\pm$ 0,23 a	0,27 $\pm$ 0,09 a	0,30 $\pm$ 0,19 a	0,55 $\pm$ 0,21 a	0,25 $\pm$ 0,12 a	0,30 $\pm$ 0,17 ab	0,16 $\pm$ 0,09
1500	raiz	-	-	-	2,51 $\pm$ 1,57 a A	0,77 $\pm$ 0,44 a A	1,93 $\pm$ 1,71 b A	0,75 $\pm$ 0,31 b B	0,35 $\pm$ 0,14 b B	0,49 $\pm$ 0,37 b B	0,35 $\pm$ 0,09 B
	parte aérea	-	-	-	0,65 $\pm$ 0,16 a A	0,32 $\pm$ 0,11 ab A	0,33 $\pm$ 0,05 ab A	0,47 $\pm$ 0,14 a B	0,26 $\pm$ 0,10 a A	0,20 $\pm$ 0,06 a B	0,12 $\pm$ 0,08 B
5000	raiz	-	-	-	2,23 $\pm$ 0,85 a A	1,26 $\pm$ 0,60 ab A	0,97 $\pm$ 0,30 ab A	5,73 $\pm$ 1,70 c B	0,36 $\pm$ 0,19 b B	0,46 $\pm$ 0,24 b B	0,25 $\pm$ 0,07 B
	parte aérea	-	-	-	0,70 $\pm$ 0,29 a A	0,39 $\pm$ 0,13 a A	0,32 $\pm$ 0,21 a A	0,42 $\pm$ 0,12 a B	0,21 $\pm$ 0,05 a B	0,22 $\pm$ 0,10 a A	0,07 $\pm$ 0,04 C
20000	raiz	-	-	-	5,34 $\pm$ 3,11 b	2,66 $\pm$ 1,71 bc	2,67 $\pm$ 1,55 c	5,73 $\pm$ 1,70 c	2,42 $\pm$ 0,61 c	3,31 $\pm$ 1,13 c	0,56 $\pm$ 0,00
	parte aérea	-	-	-	1,61 $\pm$ 1,01 bc	0,67 $\pm$ 0,30 cd	0,94 $\pm$ 0,73 bc	1,07 $\pm$ 0,38 b	0,46 $\pm$ 0,10 b	0,61 $\pm$ 0,31 bc	0,13 $\pm$ 0,01
30000	raiz	-	-	-	5,72 $\pm$ 2,23 b	2,38 $\pm$ 0,86 c	3,34 $\pm$ 1,41 c	4,63 $\pm$ 0,04 ac	2,04 $\pm$ 0,02 c	2,59 $\pm$ 0,02 c	-
	parte aérea	-	-	-	1,95 $\pm$ 0,14 c	0,83 $\pm$ 0,08 d	1,12 $\pm$ 0,10 c	1,58 $\pm$ 0,05 b	0,64 $\pm$ 0,06 b	0,94 $\pm$ 0,10 c	-

Nota: médias seguidas de letras maiúsculas diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo para uma dada concentração de As; as letras minúsculas diferentes dizem respeito à existência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias nas diversas concentrações de As para um dado dia.

**Anexo XIV – Coeficientes de correlação de Spearman entre a concentração de As e as concentrações dos elementos químicos analisados (Ca, Mg, Mn, Cu, Fe, K, P e Zn) na raiz e na parte aérea das plantas, no final do ensaio.**

Coeficiente de correlação de Spearman		As raiz	As parte aérea	Ca raiz	Ca parte aérea	Mg raiz	Mg parte aérea	Mn raiz	Mn parte aérea	K raiz	K parte aérea	P raiz	P parte aérea	Cu raiz	Cu parte aérea	Fe raiz	Fe parte aérea	Zn raiz	Zn parte aérea
As raiz	Correlation Coefficient	1,000																	
	Sig. (2-tailed)																		
	N	6																	
As parte aérea	Correlation Coefficient	1,000	1,000																
	Sig. (2-tailed)																		
	N	6	6																
Ca raiz	Correlation Coefficient	,543	,543	1,000															
	Sig. (2-tailed)	,266	,266																
	N	6	6	6															
Ca parte aérea	Correlation Coefficient	,486	,486	,943	1,000														
	Sig. (2-tailed)	,329	,329	,005															
	N	6	6	6	6														
Mg raiz	Correlation Coefficient	,371	,371	,143	-,086	1,000													
	Sig. (2-tailed)	,468	,468	,787	,872														
	N	6	6	6	6	6													
Mg parte aérea	Correlation Coefficient	,714	,714	,600	,657	,429	1,000												
	Sig. (2-tailed)	,111	,111	,208	,156	,397													
	N	6	6	6	6	6	6												
Mn raiz	Correlation Coefficient	,257	,257	-,086	-,200	,771	,429	1,000											
	Sig. (2-tailed)	,623	,623	,872	,704	,072	,397												
	N	6	6	6	6	6	6	6											
Mn pa	Correlation Coefficient	-,086	-,086	,257	,371	-,086	,257	-,486	1,000										
	Sig. (2-tailed)	,872	,872	,623	,468	,872	,623	,329											
	N	6	6	6	6	6	6	6	6										
K raiz	Correlation Coefficient	-,543	-,543	-,543	-,600	,486	-,143	,600	-,086	1,000									
	Sig. (2-tailed)	,266	,266	,266	,208	,329	,787	,208	,872										
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6									
K parte aérea	Correlation Coefficient	,600	,600	,600	,771	-,257	,657	-,371	,543	-,714	1,000								
	Sig. (2-tailed)	,208	,208	,208	,072	,623	,156	,468	,266	,111									
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6								
P raiz	Correlation Coefficient	-,257	-,257	-,600	-,771	,600	-,314	,371	-,029	,714	-,657	1,000							
	Sig. (2-tailed)	,623	,623	,208	,072	,208	,544	,468	,957	,111	,156								
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6							
P parte aérea	Correlation Coefficient	,200	,200	,200	,257	,543	,771	,714	,143	,486	,143	,029	1,000						
	Sig. (2-tailed)	,704	,704	,704	,623	,266	,072	,111	,787	,329	,787	,957							
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6						
Cu raiz	Correlation Coefficient	,486	,486	,943	1,000	-,086	,657	-,200	,371	-,600	,771	-,771	,257	1,000					
	Sig. (2-tailed)	,329	,329	,005		,872	,156	,704	,468	,208	,072	,072	,623						
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6					
Cu parte aérea	Correlation Coefficient	-,257	-,257	-,143	,086	-,486	,086	,143	-,314	,086	,029	-,543	,314	,086	1,000				
	Sig. (2-tailed)	,623	,623	,787	,872	,329	,872	,787	,544	,872	,957	,266	,544	,872					
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6				
Fe raiz	Correlation Coefficient	-,429	-,429	-,886	-,943	,314	-,429	,371	-,200	,771	-,714	,886	,029	-,943	-,143	1,000			
	Sig. (2-tailed)	,397	,397	,019	,005	,544	,397	,468	,704	,072	,111	,019	,957	,005	,787				
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6			
Fe parte aérea	Correlation Coefficient	,029	,029	,257	,371	,086	,543	,543	-,200	,257	,086	-,429	,771	,371	,771	-,257	1,000		
	Sig. (2-tailed)	,957	,957	,623	,468	,872	,266	,266	,704	,623	,872	,397	,072	,468	,072	,623			
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6		
Zn raiz	Correlation Coefficient	<b>,829</b>	<b>,829</b>	,829	,771	,486	,886	,257	,257	-,371	,657	-,314	,486	,771	-,257	-,600	,257	1,000	
	Sig. (2-tailed)	<b>,042</b>	<b>,042</b>	,042	,072	,329	,019	,623	,623	,468	,156	,544	,329	,072	,623	,208	,623		
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
Zn parte aérea	Correlation Coefficient	,371	,371	,371	,600	-,143	,771	,200	,143	-,200	,657	-,657	,657	,600	,657	-,486	,771	,486	1,000
	Sig. (2-tailed)	,468	,468	,468	,208	,787	,072	,704	,787	,704	,156	,156	,156	,208	,156	,329	,072	,329	
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Nota: \* Correlação é significante ao nível de 0,05; \*\* Correlação é significante ao nível de 0,01.

**Anexo XV – Coeficientes de correlação de Spearman entre a concentração de As e as variáveis fisiológicas, no final do ensaio.**

Coeficiente de correlação de Spearman		As raiz	As parte aérea	Comp. raiz	Comp. parte aérea	Massa fresca total	Massa fresca raiz	Massa fresca parte aérea	Área foliar	Número de folhas	Massa seca raiz	Massa seca parte aérea	Massa seca total	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total	Razão clorofila a/b
As raiz	Correlation	1,000															
	Coefficient	.															
	Sig. (2-tailed)																
As parte aérea	Correlation	1,000	1,000														
	Coefficient	.	.														
	Sig. (2-tailed)																
Comp. raiz	Correlation	-.600	-.600	1,000													
	Coefficient																
	Sig. (2-tailed)																
Comp. parte aérea	Correlation	-.600	-.600	,672	1,000												
	Coefficient																
	Sig. (2-tailed)																
Massa fresca total	Correlation	-.943	-.943	,787	,879	1,000											
	Coefficient																
	Sig. (2-tailed)																
Massa fresca raiz	Correlation	-.943	-.943	,800	,798	,921	1,000										
	Coefficient																
	Sig. (2-tailed)																
Massa fresca parte aérea	Correlation	-.943	-.943	,783	,880	,998	,907	1,000									
	Coefficient																
	Sig. (2-tailed)																
Área foliar	Correlation	-.600	-.600	,814	,783	,919	,849	,923	1,000								
	Coefficient																
	Sig. (2-tailed)																
Número de folhas	Correlation	-.486	-.486	,652	,837	,805	,684	,821	,746	1,000							
	Coefficient																
	Sig. (2-tailed)																
massa seca raiz	Correlation	-.486	-.486	,857	,955	,750	,750	,750	,821	,857	1,000						
	Coefficient																
	Sig. (2-tailed)																
Massa seca parte aérea	Correlation	-.600	-.600	,643	,937	,643	,643	,643	,571	,750	,929	1,000					
	Coefficient																
	Sig. (2-tailed)																
Massa seca total	Correlation	-.600	-.600	,643	,937	,643	,643	,643	,571	,750	,929	1,000	1,000				
	Coefficient																
	Sig. (2-tailed)																
Clorofila a	Correlation	-.771	-.771	,500	-.016	,104	,051	,111	,427	,041	,714	,464	,464	1,000			
	Coefficient																
	Sig. (2-tailed)																
Clorofila b	Correlation	-.429	-.429	,378	-.046	,098	,002	,098	,338	,076	,679	,393	,393	,787	1,000		
	Coefficient																
	Sig. (2-tailed)																
Clorofila total	Correlation	-.429	-.429	,381	-.080	,100	-.002	,099	,347	,024	,679	,393	,393	,813	,992	1,000	
	Coefficient																
	Sig. (2-tailed)																
Razão clorofila a/b	Correlation	-.257	-.257	,075	,037	,034	,099	,029	,046	,208	-.071	-.321	-.321	,139	,519	,461	1,000
	Coefficient																
	Sig. (2-tailed)																
Nota: * Correlação é significante ao nível de 0,05; ** Correlação é significante ao nível de 0,01.																	

**Anexo XVI – Coeficientes de correlação de Spearman entre a concentração de As e as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutatonas e ascorbatos na raiz e parte aérea das plantas, no final do ensaio.**

Coeficiente de correlação de Spearman		As raiz	As parte aérea	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> raiz	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> parte aérea	Glutatonas total raiz	Glutatonas total parte aérea	GSSG raiz	GSSG parte aérea	GSH raiz	GSH parte aérea	% redução de glutatona raiz	% glutatona parte aérea	ASC total raiz	ASC total parte aérea	DAs raiz	DAs parte aérea	As raiz	As parte aérea	% redução ASC raiz	% redução ASC parte aérea
As raiz	Correlation Coefficient	1,000																			
	Sig. (2-tailed)	.																			
	N	6																			
As parte aérea	Correlation Coefficient	1,000	1,000																		
	Sig. (2-tailed)	.	.																		
	N	6	6																		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> raiz	Correlation Coefficient	,100	,100	1,000																	
	Sig. (2-tailed)	,873	,873	.																	
	N	5	5	35																	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> parte aérea	Correlation Coefficient	,400	,400	,040	1,000																
	Sig. (2-tailed)	,600	,600	,858	.																
	N	4	4	23	30																
Glutatonas total raiz	Correlation Coefficient	,486	,486	,380	,173	1,000															
	Sig. (2-tailed)	,329	,329	,025	,361	.															
	N	6	6	35	30	44															
Glutatonas total parte aérea	Correlation Coefficient	,943	,943	,108	-,107	,532	1,000														
	Sig. (2-tailed)	,005	,005	,535	,575	,000	.														
	N	6	6	35	30	44	44														
GSSG raiz	Correlation Coefficient	,829	,829	,232	,473	,882	,456	1,000													
	Sig. (2-tailed)	,042	,042	,180	,008	,000	,002	.													
	N	6	6	35	30	44	44	44													
GSSG parte aérea	Correlation Coefficient	,886	,886	,178	-,158	,652	,829	,626	1,000												
	Sig. (2-tailed)	,019	,019	,336	,441	,000	,000	,000	.												
	N	6	6	32	26	40	40	40	40												
GSH raiz	Correlation Coefficient	,943	,943	,165	,622	,692	,449	,918	,572	1,000											
	Sig. (2-tailed)	,005	,005	,343	,000	,000	,002	,000	,000	.											
	N	6	6	35	30	44	44	44	44	44											
GSH parte aérea	Correlation Coefficient	,943	,943	,088	-,208	,483	,920	,367	,707	,343	1,000										
	Sig. (2-tailed)	,005	,005	,616	,270	,001	,000	,014	,000	,023	.										
	N	6	6	35	30	44	44	44	44	44	44										
% redução de glutatona raiz	Correlation Coefficient	-,029	-,029	-,105	-,298	-,030	,296	-,142	-,019	-,123	,578	1,000									
	Sig. (2-tailed)	,957	,957	,550	,110	,846	,051	,357	,909	,427	,000	.									
	N	6	6	35	30	44	44	44	44	44	44	44									
% redução glutatona parte aérea	Correlation Coefficient	-,486	-,486	,238	-,521	,220	-,075	-,168	-,037	-,496	-,018	,065	1,000								
	Sig. (2-tailed)	,329	,329	,168	,003	,152	,627	,277	,822	,001	,907	,677	.								
	N	6	6	35	30	44	44	44	44	44	44	44	44								
ASC total raiz	Correlation Coefficient	,429	,429	-,221	,055	,278	,434	,249	,484	,225	,514	,272	-,035	1,000							
	Sig. (2-tailed)	,397	,397	,241	,789	,092	,007	,132	,004	,175	,001	,099	,834	.							
	N	6	6	30	26	38	38	38	34	38	38	38	38	38							
ASC total parte aérea	Correlation Coefficient	,829	,829	,091	,329	,674	,344	,718	,425	,653	,338	,043	-,064	,378	1,000						
	Sig. (2-tailed)	,042	,042	,601	,075	,000	,022	,000	,006	,000	,025	,781	,680	,019	.						
	N	6	6	35	30	44	44	44	44	44	44	44	44	38	44						
DAs raiz	Correlation Coefficient	-,203	-,203	-,085	-,074	-,010	-,048	-,055	-,174	-,091	,142	,208	,020	,666	,095	1,000					
	Sig. (2-tailed)	,700	,700	,653	,726	,954	,779	,748	,333	,593	,402	,216	,907	,000	,575	.					
	N	6	6	30	25	37	37	37	33	37	37	37	37	34	37	37					
DAs parte aérea	Correlation Coefficient	,522	,522	,104	,195	,439	,260	,435	,265	,385	,317	,156	,001	,223	,823	-,093	1,000				
	Sig. (2-tailed)	,288	,288	,553	,302	,003	,088	,003	,099	,010	,036	,312	,995	,178	,000	,586	.				
	N	6	6	35	30	44	44	44	40	44	44	44	44	38	44	37	44				
AsA raiz	Correlation Coefficient	,543	,543	-,223	,185	,243	,353	,354	,255	,417	,326	,097	-,279	,602	,368	-,009	,305	1,000			
	Sig. (2-tailed)	,266	,266	,220	,336	,126	,024	,023	,127	,007	,037	,548	,077	,000	,018	,957	,053	.			
	N	6	6	32	29	41	41	41	37	41	41	41	41	41	36	41	41				
AsA parte aérea	Correlation Coefficient	,829	,829	,185	,517	,621	,421	,742	,551	,745	,348	-,051	-,263	,556	,652	,360	,235	,442	1,000		
	Sig. (2-tailed)	,042	,042	,288	,003	,000	,004	,000	,000	,000	,021	,742	,084	,000	,000	,029	,124	,004	.		
	N	6	6	35	30	44	44	44	40	44	44	44	44	38	44	37	44	41	44		
% redução ASC raiz	Correlation Coefficient	-,029	-,029	-,001	,110	-,007	-,023	,081	-,208	,144	-,075	-,056	-,142	-,554	-,095	-,933	,068	,231	-,300	1,000	
	Sig. (2-tailed)	,957	,957	,996	,602	,969	,889	,627	,238	,388	,655	,739	,396	,001	,570	,000	,692	,174	,067	.	
	N	6	6	31	25	38	38	38	34	38	38	38	38	35	38	37	38	36	38	38	
% redução ASC parte aérea	Correlation Coefficient	-,086	-,086	,100	,223	-,158	-,072	-,045	,035	,064	-,178	-,212	-,255	,077	-,421	,217	-,758	,051	,296	-,117	1,000
	Sig. (2-tailed)	,872	,872	,566	,237	,307	,641	,774	,831	,678	,247	,167	,095	,646	,004	,197	,000	,752	,051	,483	.
	N	6	6	35	30	44	44	44	40	44	44	44	44	38	44	37	44	41	44	38	44

Nota: \* Correlação é significativa ao nível de 0,05; \*\* Correlação é significativa ao nível de 0,01.